

RAFAEL DE MORAIS GARAY

**USO DE SONDAS FLUORESCENTES PARA AVALIAÇÃO SEMINAL DE
EJACULADO DE GATO DO MATO PEQUENO (*Leopardus tigrinus*) E
ENSAIO DE LIGAÇÃO À MEMBRANA PERIVITELINA DE OVO DE
GALINHA (*Gallus gallus*) COMO FERRAMENTA DE PREDIÇÃO DE
FERTILIDADE ESPERMÁTICA.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

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

T

G212u
2012

Garay, Rafael de Morais, 1986-

Uso de sondas fluorescentes para avaliação seminal de ejaculado de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) e ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como ferramenta de predição de fertilidade espermática / Rafael de Morais Garay. – Viçosa, MG, 2012. vi, 57f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Felídeo - Espermatozoide - Análise. 2. Sêmen - Criopreservação. 3. Sondas DNA. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

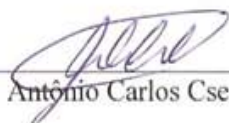
CDD 22. ed. 636.08926

RAFAEL DE MORAIS GARAY

**USO DE SONDAS FLUORESCENTES PARA AVALIAÇÃO SEMINAL DE
EJACULADO DE GATO DO MATO PEQUENO (*Leopardus tigrinus*) E ENSAIO
DE LIGAÇÃO À MEMBRANA PERIVITELINA DE OVO DE GALINHA
(*Gallus gallus*) COMO FERRAMENTA DE PREDIÇÃO DE FERTILIDADE
ESPERMÁTICA**

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

APROVADA: 09 de maio de 2012.



Antônio Carlos Csermak Júnior



João Bosco Gonçalves de Barros



Tarcizio Antônio Rego de Paula
(Orientador)

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	4
1. Objetivo Geral	4
2. Objetivos Específicos.....	4
REVISÃO DE LITERATURA	5
1. Gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i> Schreber, 1775).....	5
2. Fisiologia Reprodutiva de Felinos.....	5
3. Coleta de Sêmen	6
4. Criopreservação do Sêmen	7
5. Avaliação Espermática	9
5.1. Uso de Sondas Fluorescentes.....	11
5.2. Ensaio de Ligação de Gametas	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
ARTIGO	28
RESUMO	28
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	33
6. Animais.....	33
7. Coleta e Processamento do Sêmen.....	33
8. Avaliação Espermática	34
9. Teste de ligação de espermatozoides à zona pelúcida de ovócito de gata doméstica... 36	
10. Ensaio de ligação de espermatozoides em membrana perivitelínica de ovos de galinhas	37
11. Criopreservação espermática.....	38
12. Análise estatística.....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	56
1. ANEXO I: Composição dos meios utilizados.....	56
2. ANEXO II: Diluições dos Fluoróforos para Preparo das Soluções Estoque e de Trabalho das Sondas Fluorescentes	57

RESUMO

GARAY, Rafael de Moraes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2012. **Uso de sondas fluorescentes para avaliação seminal de ejaculado de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) e ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como ferramenta de predição de fertilidade espermática.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Coorientador: José Domingos Guimarães.

Diversas populações de carnívoros silvestres encontram-se ameaçados de extinção, principalmente devido à descaracterização de habitats e a baixa variabilidade genética de populações geograficamente isoladas. Estratégias de conservação *ex situ*, dentre as quais se encontram a reprodução assistida e criopreservação de gametas visam auxiliar a manutenção de populações viáveis. O processo de criopreservação de gametas masculinos, porém, gera danos às células, os quais devem ser mensurados a fim de se avaliar metodologias e técnicas de manipulação e consequentemente aumentar a viabilidade de reprodução de espécies ameaçadas mantidas em cativeiro, a partir da utilização de reprodução assistida. O estudo teve por objetivo avaliar de forma qualitativa o ejaculado a fresco e descongelado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) utilizando-se a combinação de sondas fluorescentes e testes de ligação de espermatozoides a ovócitos heterólogos de gatas domésticas e à membrana perivitelina do ovo de galinha. Foi utilizado um gato-do-mato-pequeno, que foi anestesiado por meio de protocolo anestésico de cloridrato de quetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1,2 mg/kg). O sêmen foi coletado pelo uso de eletroejaculação e foi avaliado quanto aos aspectos físicos (cor, aspecto e volume) e também foram realizados os testes de rotina a seguir: motilidade espermática, vigor espermático, concentração de espermatozoides no ejaculado, morfologia e teste hiposmótico. Posteriormente o sêmen foi criopreservado em palhetas francesas na concentração de 20×10^6 espermatozoides móveis/mL, em meio à base de TRIS citrato, 20% de gema de ovo e concentração final de 6% de glicerol e 0,5% de Equex. Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal foi usada a combinação de três sondas fluorescentes, iodeto de propídio (IP), Hoescht 33342 (H342) e a aglutinina *Pisium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA). Para os testes de ligação de espermatozoides à zona pelúcida de ovócito de gata doméstica e à membrana perivitelina de ovos de galinha, o sêmen foi coincubado na concentração de $0,5 \times 10^6$ espermatozoides móveis/mL, em meio de manutenção TCM 199 modificado e mantido em estufa a 38°C

com pressão atmosférica de 5% de CO₂ durante uma hora. Os ejaculados obtidos apresentaram valores médios satisfatórios para vigor e motilidade (4,33% e 80,0%, respectivamente), porém, diminuíram no sêmen descongelado ($p < 0,05$). O ejaculado a fresco apresentou-se com valores de patologias espermáticas abaixo do observado em outros estudos com sêmen a fresco de gato-do-mato (19%), no sêmen descongelado houve aumento de espermatozoides defeituosos ($p < 0,05$), devido exclusivamente ao aumento nos defeitos maiores. O percentual de células reativas ao teste hiposmótico foi menor ($p < 0,05$) no sêmen descongelado em relação ao sêmen a fresco (13,0% e 71,66%, respectivamente). A associação das sondas IP, H342 e FITC-PSA mostrou-se eficaz para a distinção de diferentes subpopulações de espermatozoides em um mesmo ejaculado, porém houve dificuldade em se identificar a coloração pelo FITC-PSA em associação com o H342. Houve redução ($p < 0,05$) da população com membrana plasmática e acrossomal íntegras no sêmen descongelado em relação ao sêmen a fresco e aumento na população com membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra, que foi inversamente proporcional à motilidade entre estes dois tratamentos. Em relação aos testes de ligação de espermatozoides a ovócitos heterólogos e a membranas perivitelina, tanto o sêmen a fresco quanto o descongelado de gato-do-mato-pequeno apresentaram adesão aos substratos testados e ocorreu redução ($p < 0,05$) na quantidade de espermatozoides aderidos nos ovócitos e nas membranas no sêmen descongelado. As metodologias de avaliação qualitativa de associação de sondas fluorescentes e testes de ligação de espermatozoides a ovócitos e membrana perivitelina de ovo de galinha se mostraram úteis na avaliação de sêmen a fresco e descongelado de gato-do-mato-pequeno.

ABSTRACT

GARAY, Rafael de Moraes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2012. **Use of fluorescent probes to assess seminal ejaculate of oncilla (*Leopardus tigrinus*) and binding assay with perivitelline layer of chicken's egg (*Gallus gallus*) as a tool for prediction of sperm fertility.** Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co-Adviser: José Domingos Guimarães.

Several populations of wild carnivores are threatened with extinction, mainly due to fragmentation of habitats and low genetic variability of geographically isolated populations. Ex situ conservation strategies, like assisted reproduction and cryopreservation of gametes intended to assist the maintenance of viable populations. Cryopreservation process of male gametes, however, causes damages to cells, which are measured in order to evaluate methodologies and handling techniques to, therefore, increase the viability of reproduction with endangered species in captivity, using assisted reproduction. The study aimed to assess qualitatively the fresh and thawed semen of oncilla (*Leopradus tigrinus*) using a combination of fluorescent probes and tests of sperm binding to heterologous oocytes of domestic cats and the perivitelline layer of chicken egg. It was used a single individual of oncilla which was anesthetized by anesthetic of ketamine (10 mg / kg) and xylazine (1.2 mg / kg). The semen was collected by electroejaculation and evaluated to the physical aspects (color, appearance and volume) and were also carried out routine tests as follows: sperm motility, spermatic vigor, concentration of spermatozoa in the ejaculate, morphology and hypoosmotic test. Subsequently, the semen was cryopreserved in French straws at a concentration of 20×10^6 motile sperm / ml in TRIS medium based on citrate, 20% of egg yolk and final concentration of 6% glycerol and 0.5% Equex. To asses the integrity of the plasma and acrosomal membrane it was used a combination of three fluorescent probes, propidium iodide, Hoechst 33342 and agglutinin *Pisium sativum* isoticionato conjugated (FITC-PSA). For binding tests of sperm it was used oocytes of domestic cat and perivitelline layer of chicken eggs, semen was co-incubated at 0.5×10^6 mobile spermatozoa / ml in maintenance medium TCM 199 modified and incubated at 38 ° C at atmospheric pressure of 5% CO² for one hour. The ejaculates obtained presented satisfactory medial values for vigor and motility (4.33% and 80.0%, respectively), however, decreased this values in frozen-thawed semen (p <0.05). The fresh ejaculate was presented with values of sperm pathologies below in relation of values observed in

other studies with fresh semen of *oncilla* (19%), the thawed semen increased values of defective cells ($p < 0.05$), due exclusively to the increase in larger defects. The percentage of cells reactive to the hypoosmotic test was lower ($p < 0.05$) in frozen-thawed semen compared to fresh semen (13.0% and 71.66%, respectively). The probes association of propidium iodide, Hoescht 33342 and FITC-PSA was effective to distinguish different subpopulations of sperm in one ejaculation, but there was a difficulty in identifying the staining by FITC-PSA in combination with H342. The population with the intact plasmatic and acrosomal layers decreased ($p < 0.05$) in frozen-thawed semen compared to fresh semen and increased the population with damaged plasmatic layer and intact acrosome layer, which was inversely proportional to motility between these two treatments. For binding tests of *oncilla* sperm to heterologous oocyte and perivitelline layer, both fresh and thawed semen showed adhesion to the substrates and decrease ($p < 0.05$) in number of sperm adhered to the oocyte membrane of the thawed semen. The qualitative methods of sperm evaluation using fluorescent probes associations and binding assays of sperm with heterologous oocytes and perivitelline layers of chicken's egg proved useful in the evaluation of fresh and thawed semen of *oncilla*.

INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento populacional em nosso planeta é constante e rápido, o que torna a fragmentação de habitat uma realidade contínua e responsável por uma aceleração abrupta no processo de extinção de espécies (Ralls *et al.*, 1979; O'Brien *et al.*, 1985, Wildt *et al.*, 1987). A crescente degradação ambiental provocada pelos desmatamentos, construções de barragens, acidentes como derramamento de produtos químicos e queimadas têm como consequência direta a redução e a fragmentação dos inúmeros ecossistemas, levando uma grande diversidade de espécies a sofrer rápido declínio em seu número com consequente perda da diversidade genética das populações (Guimarães, 2002). Neste sentido, a consequente uniformidade gênica das espécies silvestres desencadeia uma série de fatores que influenciam o processo de extinção, dentre estes se destacam a maior suscetibilidade às doenças, aumento de anormalidades espermáticas, diminuição da fertilidade e aumento da mortalidade infanto-juvenil (Wildt *et al.*, 1987; Munson *et al.*, 1996; Eizirik *et al.*, 2001).

Todos os felídeos (com exceção do gato doméstico, *Felis catus*) estão sob algum grau de ameaça de extinção e várias espécies são vistas como criticamente em perigo (IUCN, 2012). Com o intuito de impedir extinções de espécies ameaçadas, estratégias de conservação *ex situ* são traçadas na tentativa de manter a viabilidade genética de populações, dentre as quais se encontram as técnicas de reprodução assistida e formação de bancos de germoplasma (Leibo & Songsasen, 2002; Andrabi & Maxwell, 2007). Entre as estratégias de reprodução assistida, estão a criopreservação de gametas, a inseminação artificial, a fertilização *in vitro*, a transferência de embriões e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais (Jewgenow & Stolte, 1996; Wildt, *et al.*, 1983; Swanson, 1998).

Nesse contexto a manipulação e criopreservação de sêmen permitem aumentar a eficácia de programas de reprodução assistida com um número limitado de machos doadores, uma vez que não há a necessidade de translocação geográfica de indivíduos mantidos em cativeiro ou mesmo de vida livre, mas apenas o transporte de sêmen congelado (Swanson, 1998). O sêmen criopreservado favorece a inseminação de mais de uma fêmea com o material biológico estocado e também reduz as chances de

disseminação de doenças transmissíveis pelo contato sexual (Donoghue *et al.*, 1992; Guimarães, 2002).

O congelamento de sêmen causa danos aos espermatozoides, como a desestabilização das membranas plasmática e acrossomal o que gera a morte de grande parte das células viáveis e aumento de patologias de espermatozoides no sêmen descongelado. Esta última uma característica comum entre as espécies felinas (Byers *et al.*, 1989, Pukazhenthii *et al.*, 1999, Leibo & Songsasen, 2002). Alguns dos danos causados pela criopreservação podem ser evitados ou minimizados pela diluição da amostra em meio adequado para criopreservação. Um diluente ideal para felinos, no entanto, ainda não foi determinado (Luvoni *et al.*, 2003).

Para avaliar-se a eficácia de técnicas utilizadas em criopreservação de sêmen são necessários testes que forneçam informações sobre a integridade celular e a capacidade de fertilização de espermatozoides, os quais podem ser *in vivo* ou *in vitro*. Testes *in vivo*, embora decisivos na determinação da fertilidade do sêmen, requerem um grande número de animais por tratamento e podem sofrer influências de fatores relacionados à fêmea. As análises *in vitro*, como: vigor, motilidade espermática e morfologia espermática, apesar de serem realizadas há bastante tempo, são influenciadas pela natureza subjetiva, variabilidade entre técnicos e diferenças na implementação de padrões para a avaliação (Arruda, 2000; Verstegen *et al.*, 2002; Celeghini, 2005).

O uso de sondas fluorescentes ou fluorocromos isolados ou em combinações possibilita uma análise criteriosa da integridade estrutural dos componentes celulares dos espermatozoides, uma vez que se caracterizam pela marcação de estruturas específicas das células além de detectar a integridade estrutural e funcional de forma clara (Peterson *et al.*, 1974; Arruda, 2000; Silva & Gadella, 2006).

Testes *in vitro* de ligação à zona pelúcida de ovócitos homólogos ou mesmo heterólogos são utilizados em rotina de avaliação da capacidade de fertilização de sêmen descongelado para muitas espécies domésticas e silvestres. No entanto, a obtenção de uma quantidade satisfatória de ovócitos de mamíferos domésticos e silvestres requer o uso de muitas fêmeas, o que torna o “efeito fêmea” um fator de grande influencia nos resultados (Santos, 2009).

Diante deste entrave, o uso de membrana perivitelina de ovo de galinha é um método promissor de interação de gametas. O teste de diferentes amostras de sêmen sobre a mesma superfície ligante, ou seja, diferentes fragmentos de uma mesma membrana, o que minimiza a variação causada pelo “efeito fêmea”. Além disso, a membrana perivitelina é de fácil obtenção e manipulação. Portanto baseando-se em resultados satisfatórios com mamíferos domésticos (Amorim, 2008; Santos, 2009), esta técnica pode ser utilizada na avaliação seminal de felinos silvestres, como o gato-domato-pequeno (*Leopardus tigrinus*).

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar o uso de sondas fluorescentes e testes de ligação de espermatozoides na qualificação de sêmen de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) a fresco e descongelado

2. Objetivos Específicos

- Avaliar a integridade das membranas plasmáticas e acrossomal usando sondas fluorescentes no sêmen a fresco e descongelado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*);
- Criopreservar sêmen de gato-do-mato-pequeno mantido em catifeiro com meio a base de TRIS-citrato 20% de gema de ovo, com glicerol e Equex STM Paste®;
- Avaliar a capacidade de ligação do sêmen de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a fresco e descongelado, usando os testes de ligação à zona pelúcida de ovócitos de gata e à membrana perivitelina de galinha.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775)

A família Felidae é um dos grupos com maior diversidade de carnívoros e inclui espécies que variam em tamanho desde 1 kg (gato doméstico- *Felis catus*) até mais de 230 kg (tigre – *Panthera tigris*). Esta família compreende um grupo de espécies fenotipicamente díspares que vivem em diversas regiões geográficas (Emmons, 1988). O gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) é a menor espécie de felino do Brasil, com porte e proporções semelhantes aos do gato doméstico. Apresenta comprimento corporal médio de 50 cm, cauda de aproximadamente 25 cm e o peso varia de 1,75 a 3,5 kg (Oliveira & Cassaro, 2005). É um animal arborícola, que se caracteriza pela coloração de pelagem amarelada com manchas negras pelo corpo (rosetas), podendo ocorrer variação melânica na pelagem (Oliveira & Cassaro, 2005). Apresenta hábitos solitários e predominantemente noturnos, mas em algumas áreas apresenta atividade diurna elevada (IUCN, 2012). É um carnívoro específico, alimenta-se de pequenos vertebrados, mamíferos, lagartos e pequenas aves. O gato-do-mato-pequeno está classificado como vulnerável pela IUCN e listado no apêndice I da CITES- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES 2010).

2. Fisiologia Reprodutiva de Felinos

O órgão copulatório de felinos do gênero *Leopardus*, exceto o gato maracajá (*Leopardus wiedii*) que não apresenta espículas penianas, assemelha-se ao do gato doméstico, (Swanson *et al.*, 1995, Morais, 1999). Espículas penianas são estruturas córneas que começam a se desenvolver com aproximadamente 12 semanas de idade (Lopes, 2002). São responsáveis pelo estímulo neuro-endócrino necessário para o desencadeamento da ovocitação durante a cópula (Johnston *et al.*, 2001) e são características sexuais secundárias cujo crescimento é andrógeno dependente, podendo serem usadas como preditor da capacidade androgênica individual (Aronson & Cooper, 1967).

A puberdade dos felinos está correlacionada com o peso corporal adulto ocorrendo mais cedo nas fêmeas (Gruffydd-Jones, 1993). As fêmeas de pequenos felinos neotropicais são poliestrais de ovulação induzida, com a ovulação ocorrendo somente após o estímulo copulatório (Moreira, 2001). Eaton (1984), por meio de

estudos de hormônios esteróides reprodutivos e da atividade ovariana em fêmeas de pequenos felinos em cativeiro, observou que essas espécies não apresentavam padrão característico de sazonalidade reprodutiva, portanto experimentações reprodutivas podem ser conduzidas durante o ano todo.

3. Coleta de Sêmen

Amostras de sêmen a serem utilizadas em programas de reprodução assistida em carnívoros podem ser obtidas por meio de vagina artificial (Sojka & Jennings, 1970; Sojka *et al.*, 1970; Zambelli & Belluzzi, 1998), coleta diretamente do epidídimo ou ductos deferentes (Howard *et al.*, 1986; Axné, 1998), ou mesmo por massagem retal, coleta pós coito, manipulação peniana e eletroejaculação (Platz *et al.*, 1978; Dooley & Pineda, 1983; Johnstone, 1984; Howard *et al.*, 1986). O método de coleta do sêmen em felinos, assim como em outras espécies, pode afetar a concentração espermática, a motilidade e o potencial de fertilidade das células espermáticas. A eletroejaculação é a técnica mais apropriada para animais silvestres, uma vez que permite ser realizada em animais anestesiados para maior segurança do animal e da equipe de trabalho e consiste na estimulação dos nervos ligados aos órgãos reprodutores por meio de correntes elétricas fracas (Howard, 1993). Diferentes protocolos de estimulação foram descritos para felinos, mas muitos autores utilizam o descrito por Howard *et al.* (1986), que consiste em um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 5 Volts (V) aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos), cada estímulo é aplicado de forma a demorar aproximadamente 1 segundo (s) para ir de 0 V à voltagem desejada, permanecendo por 2 a 3 s na voltagem desejada, seguido por um retorno abrupto a 0 V, onde permanece por 2 a 3 s. Já Ávila (2009) realizou adaptação da técnica com sucesso na coleta de sêmen de jaguatiricas e Deco (2011), utilizando da mesma sequência de estímulos de Ávila obteve êxito na coleta de sêmen de onça parda (*Puma concolor*).

Os métodos de eletroejaculação são aplicados com sucesso em várias espécies de felinos como o Puma (*Puma concolor* - Deco 2011), o tigre (*Panthera tigris* - Donoghue *et al.*, 1992), o gato-leopardo (*Felis bengalensis* - Andrews *et al.*, 1992; Pukazhenthil *et al.*, 2000), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*- Morais *et al.*, 2002; Queiroz, 2003, Ávila, 2009; Araujo 2012), o gato-maracajá (*Leopardus wiedii* - Morais *et al.*, 2002), o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* - Morais *et al.*, 2002), o guepardo (*Acinonyx jubatus* - Roth *et al.*, 1995; Swanson *et al.*, 1996b), a onça-

pintada (*Panthera onca* – Swanson *et al.*, 1996b; Morato *et al.*; 1998) e o leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa* - Pukazhenthil *et al.*, 2000). Amostras de sêmen obtidas por meio de eletroejaculação tendem a serem mais volumosas, ácidas, com menor concentração espermática e eventualmente contaminadas com urina, uma vez que a estimulação simpática por este método é maior (Seager & Platz, 1976; Howard, 1993; Setchell *et al.*, 1994; Dooley *et al.*, 1991). A contaminação do sêmen por urina pode ocorrer devido à voltagem utilizada, quando essa excede o máximo necessário à ejaculação, ou devido ao posicionamento muito cranial da probe retal (Howard, 1993). A fim de se evitar a contaminação do sêmen por urina pode-se fazer uso da lavagem da bexiga por meio da introdução de sonda uretral estéril a partir do óstio uretral externo até a região da bexiga e realizar sucessivas lavagens com solução fisiológica aquecida a 38 °C, utilizando-se seringa, previamente à realização das coletas (Ávila, 2009).

Vários protocolos anestésicos foram usados para a eletroejaculação em felinos, sendo atualmente os mais usados a associação de cloridrato de quetamina (10 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (2 mg/Kg) pela via intramuscular (Ávila, 2009) e tiletamina/zolazepam (5-10 mg/kg; Zoletil® 50, Virbac) com manutenção anestésica com isoflurano inalatório (Queiroz, 2003).

4. Criopreservação do Sêmen

O processo de criopreservação inclui várias etapas, desde a coleta, envasamento e diluição da amostra para o congelamento até o descongelamento e inseminação, cada uma delas pode provocar danos aos espermatozoides e conseqüentemente reduzir a capacidade de fertilização da amostra de sêmen (Howard *et al.*, 1991a; Johnston *et al.*, 1991; Januskauskas *et al.*, 1996; Watson, 2000; Luvoni *et al.*, 2003; Hallap *et al.*, 2006). Durante o processo de criopreservação, a célula espermática é exposta a inúmeros fatores estressantes, que podem estar ligados ao choque térmico durante o resfriamento do sêmen, à formação de cristais intracelulares de gelo ou ao choque osmótico durante o processo de congelamento e descongelamento, ou ainda ao estresse ligado à adição e ação do crioprotetor (Watson, 2000). A resposta celular a cada particularidade deste processo é diferenciada para cada espécie (Holt, 2000b).

Atualmente existem várias descrições de protocolos de congelamento de sêmen em gato doméstico (Luvoni *et al.*, 2003; Axné & Linde-Forsberg, 2007) e em felídeos

selvagens (Howard, 1993; Swanson *et al.*, 1996a; Pukazhenthil *et al.*, 2001). Tsutsui *et al.* (2000) congelaram sêmen de gato doméstico em um diluente a base de gema de ovo, tris-frutose, ácido cítrico em uma solução de citrato de sódio e gema de ovo e relataram taxa de prenhez de 57% (8/14), quando utilizaram 50×10^6 espermatozoides para inseminação intra-uterina em fêmeas com cio natural.

Zambelli *et al.* (2002) testaram cinco curvas de resfriamento e congelamento para sêmen felino, utilizando um diluente a base de Tris, gema de ovo e glicerol. Após o processo de diluição, resfriaram as doses a uma taxa de $0,2 \text{ }^\circ\text{C/s}$, deixando em equilíbrio mais 25 min a $5 \text{ }^\circ\text{C}$, para então submeter ao processo de congelamento em botijão de nitrogênio. As amostras foram congeladas com taxas de queda de temperatura de 3,85; 9,00; 22,80; 36,00 e $43,00 \text{ }^\circ\text{C/min}$, sendo observados melhores resultados para motilidade espermática e menores danos acrossomais com as taxas de congelamento mais lentas a $3,85 \text{ }^\circ\text{C/min}$.

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

Um diluente ideal para o congelamento de sêmen felino ainda não foi definido, visto que o movimento progressivo e a morfologia acrossomal são altamente afetados nos procedimentos de criopreservação com os diluentes conhecidos. A gema de ovo no meio diluidor é amplamente utilizada como agente estabilizador da membrana plasmática, protegendo-a contra o choque térmico (Watson, 1979; Holt, 2000b; Luvoni *et al.*, 2003). Acredita-se que esta ação protetora seja fornecida pela sua ação coloidal no meio e pela presença da fosfatidilcolina, uma lipoproteína que interage com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas, protegendo-a contra o choque térmico (Watson, 1979, Bouchard *et al.*, 1990). Além disso, a gema de ovo previne a liberação da enzima hialuronidase pelo espermatozoide (Foulkes, 1977). Alguns estudos também demonstraram que a adição de detergentes a base de SDS (dodecil sulfato de sódio) - Equex STM Paste® e Orvus ES Paste® - aumentam o potencial de penetração das lipoproteínas da gema de ovo na membrana plasmática do espermatozoide (Holt, 2000b; Peña *et al.*, 2003).

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

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

5. Avaliação Espermática

A qualidade do sêmen felino é muito variável entre espécies e indivíduos (Morais *et al.*, 2002; Swanson *et al.*, 2003) e como o objetivo da criopreservação é o armazenamento de material com potencial de fertilização, a avaliação qualitativa do sêmen é de fundamental importância. Esta estimativa deve contemplar vários atributos simultaneamente para garantir maior confiabilidade na determinação do potencial de fertilização (Graham, 2001). A combinação de critérios mais amplamente usada para avaliar o sêmen inclui: aspecto, volume, pH, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática (Platz *et al.*, 1978; Howard, 1993; Swanson & Brown, 2004).

A quantificação de espermatozoides é determinada a partir da aferição do volume e da concentração do ejaculado, informações extremamente úteis para a determinação das diluições a serem realizadas. Vários fatores podem influenciar o volume e a concentração do ejaculado, incluindo o grau de estimulação sexual, o número de

ejaculações sucessivas de um mesmo animal, e o método usado para coleta do sêmen (Wildt, 1989).

A motilidade espermática é necessária para a colonização da tuba uterina e para uma fertilização normal (Yanagimachi, 1994). Este parâmetro é expresso em porcentagem de movimento retilíneo progressivo numa escala de 0% a 100% sendo 0 % para todos os espermatozoides imóveis e 100% para desempenho máximo dos espermatozoides, com movimentos progressivos. A qualidade do movimento executada pelos espermatozoides é avaliada pelo vigor dentro de uma escala de 0 a 5, sendo: 0 – sem movimento; 1 – fraco movimento lateral com alguma progressão; 2 – moderado movimento lateral com ocasional progressão; 3 – progressão lenta; 4 – progressão regular; 5 – progressão rápida. Para determinar um índice de motilidade espermática com ênfase na porcentagem de motilidade e vigor, foi criado o índice de motilidade espermática (IME), que é calculado por: $IME = \text{motilidade espermática (\%)} + (\text{vigor} \times 20)/2$ (Howard, 1993).

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

Embora ejaculados com alta proporção de espermatozoides anormais possam apresentar boa fertilidade *in vivo*, estudos *in vitro* mostraram correlações negativas entre a proporção de defeitos e a habilidade de penetração em ovócitos (Axnér & Linde-Forberg, 2007). O gato-do-mato-pequeno apresenta alta taxa de sêmen teratospérmico, ou seja, número de espermatozoides normais menores que 40% e estes defeitos morfológicos parecem estar relacionados com a variabilidade genética limitada (Swanson *et al.*, 2003). Por outro lado, em comparação à jaguatirica, o gato-do-mato-

pequeno produz um ejaculado com maior número de espermatozóides por volume seminal (Morais *et al.*, 2002).

São poucos os estudos que correlacionam morfologia espermática com fertilidade em felinos (Donoghue *et al.*, 1992; Wildt *et al.*, 1993; Axné *et al.*, 1996, Axné *et al.*, 1997, Axné *et al.*, 1998). Em um estudo com gatos domésticos Axné & Linde-Forsberg (2007) correlacionaram diferentes patologias com a fertilidade *in vivo* e somente as patologias de cabeça foram relacionadas com baixa fertilidade, e em contraste com os resultados em bovinos (Barth & Oko, 1989), um animal com elevadas proporções de gota citoplasmática proximal se mostrou fértil.

A integridade e viabilidade da membrana espermática podem ser avaliadas por meio do teste hiposmótico (Clarke & Johnson, 1987; Zavos, 1990). Quando expostos a um meio hiposmótico, espermatozóides funcionais se tornam inturgescidos para estabelecer o equilíbrio osmótico, produzindo um dobramento da cauda (Zavos, 1990). Neild *et al.* (2000) ao estudar a aplicação do teste hiposmótico na avaliação do sêmen fresco de garanhões, observaram correlação entre este e a porcentagem de espermatozoides móveis e morfologicamente normais no ejaculado e a taxa de prenhes.

5.1. Uso de Sondas Fluorescentes

O uso de sondas fluorescentes ou fluorocromos, isoladas ou em combinações, permite uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos componentes celulares, devido a sua característica de marcar estruturas específicas das células e detectar a integridade estrutural e funcional de forma clara (Peterson *et al.*, 1974; Arruda, 2000). Entretanto, a associação das sondas com o intuito de avaliar simultaneamente as membranas plasmáticas, acrossomal e a função mitocondrial, vem sendo utilizada em protocolos trabalhosos e demorados, o que torna difícil a aplicação na rotina da avaliação seminal (Celeghini, 2005).

As sondas fluorescentes podem ser usadas para avaliar a integridade da membrana plasmática (Amann & Pickett, 1987). O primeiro relato do uso de sondas fluorescentes com esta finalidade foi com sêmen humano utilizando brometo de etídio (Peterson *et al.*, 1974), no entanto, devido a sua alta toxicidade sua aplicação é cada vez mais restrita, o que impulsiona a pesquisa de novas sondas (Celeghini, 2005).

Pesquisas de integridade da membrana plasmática de felinos domésticos e silvestres são continuamente realizadas utilizando-se diferentes associações de sondas fluorescentes. Tebet (2004) utilizou iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína para verificar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de gato doméstico (*Felis catus*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*). O iodeto de propídeo (IP) possui a capacidade de penetrar células com membrana plasmática lesionada e tem afinidade ao DNA, cora em vermelho o núcleo da célula.

Baudi (2005) em seu estudo do efeito do resfriamento sobre a função espermática de sêmen criopreservado de felinos (*Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e *Felis catus*) avaliado pelo ensaio competitivo de ligação em ovócito de gata doméstica (*Felis catus*), usou o iodeto de propídeo como corante e como contra corante o supravital Hoechst. Este corante é comercializado na forma do Hoechst 33258 (H258) ou do Hoechst 33342 (H342), sendo ambos utilizados para verificar a integridade e a funcionalidade de membrana plasmática, ligando-se especificamente ao DNA e marcando o núcleo da célula em azul (Casey *et al.*, 1993; Maxwell *et al.*, 1997). A diferença entre esses corantes está na permeabilidade da membrana, uma vez que o H258 cora células com membrana lesada e o H342 marca células com membrana íntegra (De Leeuw *et al.*, 1991; Casey *et al.*, 1993; Maxwell *et al.*, 1997).

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

Araújo (2012) avaliou a utilização da associação de sondas fluorescentes para análise qualitativa da função espermática de sêmen de jaguatiricas de amostras de sêmen a fresco e descongelado, fazendo uso da combinação das sondas iodeto de propídio, Hoescht 33342 e FITC-PSA obtendo resultados satisfatórios para essa espécie silvestre.

5.2. Ensaio de Ligação de Gametas

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

Visto que a capacidade do espermatozoide se ligar à zona pelúcida é um evento crítico que culmina na fertilização (Mayenco-Aguirre & Pérez-Cortes, 1998) os testes de interação entre gametas são uma opção para avaliar a capacidade de fertilização espermática. Neste tipo de análise *in vitro*, podem ser utilizados ovócitos homólogos (da mesma espécie doadora do sêmen) ou heterólogos (espécies distintas). Ström Holst *et al.* (2000) compararam ensaios de ligação espermática em cães entre ovócitos frescos e descongelados, armazenados em solução salina. Apesar de terem encontrado diferenças significativamente maiores de ligação espermática em ovócitos frescos os resultados indicaram que os gametas descongelados podem ser usados em ensaios para avaliação espermática.

A partir de ensaios realizados com humanos desde os anos 80, o teste de ligação entre gametas homólogos mostrou-se eficaz para distinguir indivíduos pertencentes a grupos férteis, inférteis e sub-férteis (Liu & Baker, 1993; Oehninger *et al.*, 1997; Bastiaan *et al.*, 2002). Testes de ligação a ovócitos foram usados para felinos, inclusive silvestres como a jaguatirica (Howard *et al.*, 1990; Andrews *et al.*, 1992; Goodrowe, 1992; Lengwinat & Blottner, 1994; Baudi, 2005; Araújo, 2012). Apesar da maior confiabilidade relacionada aos testes de ligação, a obtenção de ovócitos exige um número maior de animais, bem como apresenta o custo mais elevado, fato que pode ser um fator limitante à sua utilização (Rota *et al.*, 1997; Tardif *et al.*, 1999). Ainda com

relação ao uso de ovócitos, a variação individual de qualidade entre as células e suas doadoras, pode gerar viés na interpretação dos resultados (Santos, 2009; Eilts, 2005).

A partir de observações realizadas por Wishart (1997) em ovos de galinhas, descobriu-se que muitos espermatozoides que não haviam fecundado o ovócito, continuavam presos à membrana perivitelina após a passagem do ovo pelo oviduto. A partir de então se avaliaram os ejaculados de galos com diferentes graus de fertilidade, em relação à ligação com a membrana perivitelina isolada, obtendo-se correlações significativas (Barbato *et al.*, 1998). Outros pesquisadores avaliaram a técnica em mamíferos, e também obtiveram resultados promissores (Santos, 2009; Amorim, 2008; Araújo, 2012).

A utilização da membrana perivitelina possui vantagens em relação aos ovócitos, uma vez que permite o teste de diferentes amostras de sêmen sobre a mesma superfície de ligação (fragmentos de uma mesma membrana), o que reduz o “efeito fêmea”. Além disso, a membrana perivitelina é de obtenção mais simples e menos dispendiosa em relação ao uso de ovócitos de mamíferos silvestres e mesmo domésticos. Formulações comerciais a partir de substrato sintético feito a partir da membrana estão disponíveis em diferentes laboratórios. Tais apresentações foram usadas em suínos e mostraram-se capazes de responder de forma diferenciada frente à avaliação de ejaculados com diferentes capacidades fertilizantes (dos Reis *et al.*, 2003). Neste contexto, o teste de ligação utilizando-se a membrana perivitelina de galinhas surge como uma ferramenta promissora na avaliação espermática de mamíferos domésticos e silvestres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann RP & Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7(3):145-173.
- Amorim EAM. 2008. Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen. Tese de Doutorado em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa MG 174p.
- Andrabi SMH & Maxwell WMC. 2007. A review of reproductive biotechnologies for conservation of endangered species. *Animal Reproduction Science* 99(3-4):223-243.
- Andrews JC; Howard JG; Bavister BD; Wildt DE. 1992. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with salt-stored zona pellucida penetration assay. *Molecular Reproduction and Development* 31:200-201.
- Araújo GR. 2012. Uso de sondas fluorescentes e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e a membrana perivitelínica de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa MG, 64 p.
- Aronson LR & Cooper ML. 1967. Penile spines of the cat: their endocrine-behaviour relations. *The Anatomical Record* 157:171.
- Arruda RP. 2000. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). Tese de Livre Docência, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia SP 121p.
- Ávila EC. 2009. Avaliação andrológica e criopreservação do sêmen de jaguatirica (*Leopardus pardalis*, LINNAEUS, 1758). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa MG 78p.

- Axnér E. 1998. Mating and artificial insemination in domestic cats. In: Simpson G; England GC; Harvey M. (eds), British Small Animal Veterinary Association Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology. BSVVA Cheltenham 105-111.
- Axnér E & Linde-Forsberg C. 2007. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: A retrospective study. *Reproduction in Domestic Animals* 42(3):282-291.
- Axnér E; Ström B; Linde-Forsberg C. 1997. Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology* 47(4):929-934.
- Axnér E; Ström B; Linde-Forsberg C; Gustavsson I; Lindblad K; Wallgren M. 1996. Reproductive disorders in 10 domestic male cats. *Journal of Small Animal Practice* 37(8):394-401.
- Axnér E; Ström-Holst B; Linde-Forsberg C. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50(6):973-979.
- Barbato GF; Cramer PG; Hammerstedt RH. 1998. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biology of Reproduction* 58:686-699.
- Barth AD & Oko RJ. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press 214-270.
- Bastiaan HS; Menkveld R; Oehninger S; Franken DR. 2002. Zona pellucida induced acrosome reaction, sperm morphology, and sperm-zona pellucida binding assessments among subfertile men. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 19:329-334.
- Baudi DLK. 2005. Efeito de dois métodos de resfriamento sobre a função espermática *in vitro* de sêmen criopreservado de felinos (*Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e *Felis catus*), avaliada através de ensaio competitivo de ligação em ovócitos de gata doméstica (*Felis catus*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná PR 76p.

- Blom E. 1973. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Veterinaermed* 25:383-391.
- Bouchard GF; Morris JK; Sikes JD; Youngquist RS. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* 34(1):147-157.
- Byers AP; Hunter AG; Seal US; Binczik GA; Reindl NJ; Tilson RL. 1989. *In vitro* induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the Siberian tiger (*Panthera tigris*). *Journal of Reproduction & Fertility* 86:599-607.
- Casey PJ; Hillman RB; Robertson KR; Yudin AI; Liu IKM; Drobins EZ. 1993. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *Journal of Andrology* 14(4):289-297.
- Celeghini ECC. 2005. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia SP 186p.
- CITES-Convention on International Trade in Endangered Species. 2010. Disponível em < <http://www.cites.org/esp/app/appendices-S.pdf> >. Acesso em 27 de dezembro de 2011.
- Clarke RN & Johnson LA. 1987. Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrossomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova *in vitro*. *Gamete Research* 16:193-204.
- CBRA-Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1998. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (2Ed.), Belo Horizonte, Brasil 65p.
- Cross NL & MEIZEL S. 1989. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction* 41:635-641.
- Deco TS. 2011. Avaliação andrológica, coleta e criopreservação de sêmen de puma (*Puma concolor* Linnaeus, 1771). Dissertação de Mestrado, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa MG. 96p.

- De Leeuw AM; Den Daas JH; Woelders H. 1991. The fix vital stain method: Simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *Journal of Andrology* 12:112-118.
- Donoghue AM; Johnston LA; Seal US; Armstrong DL; Simmons LG; Gross T; *et al.* 1992. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 96:555-564.
- Dooley MP & Pineda MH. 1983. An electroejaculator for the collection of semen from the domestic cat. *Theriogenology* 20(3):297-310.
- Dooley MP; Pineda MH; Hopper JG; Hsu WH. 1991. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electroejaculation, collection of sêmen with an artificial vagina, and mating. *American Journal of Veterinary Research*. 52:687-691.
- dos Reis GR; Bernardi ML; Wentz I; Bortolozzo FP; Weitze KF; Amann R; Kellers C; Zemmrich J. 2003. Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozóides a um substrato sintético. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38(11):1343-1349.
- Eaton RL. 1984. Surgery of smaller felid breeding. *Der Zoologische Garten* 54(1/2):101-120.
- Eilts BE. 2005. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology* 64:685-691.
- Eizirik E; Kim JH; Raymond MM; Grawshaw Jr PG; O'brien SJ; Johnson WE. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology* 10(1):65-79.
- Emmons LH. 1988. A field study of ocelots (*Felis pardalis*) in Peru. *Revue d'Ecologie (la Terre et la Vie)* 43:133-157.
- Foulkes JA. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on freezing of bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction & Fertility* 49:277-284.

- Gao DY; Liu J; Liu C; Mcgann LE; Watson PF; Kleinhans FW; Mazur P; Critser ES; Critser JK. 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction* 10:1109-1122.
- Goodrowe, K.L. 1992. Feline reproduction and artificial breeding technologies. *Animal Reproduction Science* 28:389-397.
- Graham JK. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* 68:239-247.
- Gruffydd-Jones TJ. 1993. Disorders of the reproductive system. In: Willis J & Wolf A. *Handbook of Feline Medicine*. Oxford UK-Pegamon Press 213-222.
- Guimarães MABV. 2002. Biotecnologia aplicada aos animais silvestres: aspectos éticos e conservacionistas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 26(2):58-61.
- Hallap T; Nagy S; Jaakma U; Johannisson A; Rodriguez- Martine H. 2006. Usefulness of a triple fluorochrome combination merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from estonian holstein ai bulls. *Theriogenology* 65:1122-1136.
- Hammerstedt RH; Graham JK; Nolan JP. 1990. Cryopreservation of Mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology* 11(1):73-87.
- Holt WV. 2000a. Basic aspects of frozen storage semen. *Animal Reproduction Science* 62:3-22.
- Holt WV. 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47-58.
- Howard JG. 1993. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In: Fowler ME. *Zoo and wild animal medicine Philadelphia: WB Saunders* 3ed. 390-399.
- Howard JG; Bush M; Wildt DE. 1986. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow D. *Current Therapy in Theriogenology II*. Philadelphia: W.B. Saunders 1047-1053.

- Howard JG; Brown JL; Bush M; Wildt DE. 1990. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *Journal of Andrology* 11(3):204-215.
- Howard JG; Bush M; Morton C; Morton F; Wentzel K; Wildt DE. 1991a. Comparative semen cryopreservation in ferrets (*Mustela putorius furo*) and pregnancies after laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Journal of Reproduction & Fertility* 92:109-118.
- IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Lista oficial de animais ameaçados de extinção. 2006. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/fauna-silvestre>>. Acesso 02 de julho de 2012.
- IUCN-International Union for Nature Conservation. 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 02 July 2012.
- Januskauskas A; Haard MG; Haard MC Soderquist L; Lundeheim N; Rodriguez-Martinez H. 1996. Estimation of sperm viability in frozen-thawed semen from Swedish A.I. Bulls. *Zentralbl Veterinarmed A* 43(5):281-287.
- Jewgenow K & Stolte M. 1996. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats- viability and ultrastructural investigations. *Reproduction Domestic Animals* 44:183-193.
- Johnston LA; Donoghue AM; O'brien SJ; Wildt DE. 1991. Rescue and maturation *in vitro* of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. *Biology of Reproduction* 45(6):898-906.
- Johnston SD; Root kustritz MV; Olson PNS. 2001. Section IV: The tom. In: *Canine and feline*. Philadelphia W.B. Saunders Theriogenology 497-520.
- Johnstone SD. 1984. Electroejaculation in the domestic cat. *Australian Veterinary Journal* 61:155-158.

- Katkov II; Katkova N; Critser JK; Mazur P. 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol. Chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology* 37:325-338.
- Leibo SP & Songsasen N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species. *Theriogenology* 57:303-326.
- Lengwinat T & Blottner S. 1994. *In vitro* fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 35:291-301.
- Liu DY & Baker HWG. 1993. Inhibition of acrosin activity with a Trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biology of Reproduction* 48:340-48.
- Long JA; Wildt DE; Wolfe BA; Critser JK; DeRossi RV; Howard JG. 1996. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biology of Reproduction* 54:638-646.
- Lopes MD. 2002. Biologia reprodutiva de felinos domésticos (*Felis catus*) e técnicas artificiais de reprodução. In: Anais II Simpósio Paranaense de Atualização em Reprodução Animal e I Fórum ASBIA de Inseminação Artificial. Londrina PR CBRA.
- Luvoni GC; Kalchschmidt E; Leoni S; Ruggiero C. 2003. Conservation of feline semen part I: Cooling and freezing protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 5(4):203-208.
- Maxwell WMC; Welch GR; Johnson LA. 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction of Fertility and Development* 8:1165-1178.
- Mayenco-Aguirre AM & Pérez Cortés AB. 1998. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology* 50:195-204.
- Morais RN. 1999. Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Leopardus pardalis*, Linnaeus 1758, *Leopardus wiedii*, Schinz, 1821 e *Leopardus tigrinus*, machos em

cativeiro, incluindo variações sazonais. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná PR 177p.

- Morais RN; Mucciolo RG; Gomes MLF; Lacerda O; Moraes W; Moreira N; *et al.* 2002. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 57(8):2027-2041.
- Morato RG; Guimarães MABV; Nunes ALV; Teixeira RH Carciofi AC; Ferreira F; Barnabe VH; Barnabe RC. 1998. Colheita e avaliação espermática em onça pintada (*Panthera onca*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 35:178-81.
- Moreira N. 2001. Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná PR 231p.
- Munson L; Brown JL; Bush M; Packer C; Janssen D; Reiziss SM; Wildt DE. 1996. Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera Leo*) of serengeti plains and ngorongoro crater. *Journal of Reproduction and Fertility* 108:11-15.
- Neild DM; Chaves MG; Flores M; Miragaya MH; Gonzalez E; Agüero A. 2000. The HOS Test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 32(6):351-355.
- Nelson KL; Crichton EG; Doty L; Volenec DE; Morato RG; Pope CE; *et al.* 1999. Heterologous and homologous fertilizing capacity of cryopreserved felid sperm: a model for endangered species. (Abstract). *Theriogenology* 51:290.
- O'brien SJ; Roelke ME; Marker L; Newman A; Winkler CW; Meltzer D; Colly L Everman J; Bush M; Wildt DE. 1985. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 227:1428-35.
- Oehninger S; Franken D; Kruger T. 1997. Approaching the next millennium: how should we manage andrology diagnosis in the intracytoplasmic sperm injection era? *Fertil Steril* 67:434-436.

- Oliveira TG & Cassaro K. 2005. Guia de campo dos felinos do Brasil. Instituto Pro-carnivoros, sociedade de Zoologicos do Brasil & Pró-vida Brasil, Fundação Parque Zoológico de São Paulo 80p.
- Peña-Martínez AI; Luz LL; Barrio M; Herradón PG; Quintqila LA. 2003. Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 59:1725-1739.
- Peterson RN; Silverstein K; Freund M. 1974. A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 41:485-488.
- Platz CC; Wildt DE; Seager SWJ. 1978. Pregnancy in the Domestic Cat After Artificial Insemination with Previously Frozen Spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 52:279-282.
- Pukazhenthí BS; Pelican K; Wildt DE; Howard JG. 1999. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrossomal damage. *Biology of Reproduction* 61:135-41.
- Pukazhenthí BS; Noiles E; Pelican K; Donoghue A; Wildt DE; Howard JG. 2000. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology* 40:139-50.
- Pukazhenthí B; Wildt DE; Howard JG. 2001. The Phenomenon and significance of teratospermia in felids. *Journal of Reproduction and Fertility* 57:423-433.
- Queiroz VS. 2003. Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo SP 132p.
- Ralls K; Brugger K; Ballou J. 1979. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science* 206:1101-1103.

- Rath D; Töpfer-petersen E; Michelmann HW; Schwartz P; Ebeling S. 2005. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of *in vivo* and *in vitro* produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* 63:352-362.
- Rota A; StrömB; Linde-Forsberg C; Rodriguez-Martinez H. 1997. Effects of Equex STM Paste on viability of frozenthawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38 °C. *Theriogenology* 47:1093-1101.
- Roth TL; Swanson WF; Blumer E; Wildt DE. 1995. Enhancing zona penetration by spermatozoa from a teratospermic species, the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *The Journal of Experimental Zoology* 271:323-330.
- Santos MCR. 2009. Avaliação de métodos alternativos para análises da capacidade de ligação do espermatozóide caprino e estudo do polimorfismo no gene Izumo em caprino, devido à ação do congelamento do sêmen. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa MG.
- Seager SWJ & Platz Jr CC. 1976. Semen collection and freezing in captive wild mammals. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 8°, Cracow 1075-1077.
- Setchell BP; Maddocks S; Brooks DE. 1994. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil E; Neill JD. *The physiology of reproduction*. 2.ed. New York: Raven Press 1063-1075.
- Silva PFN & Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65:958-978.
- Sinowatz F; Wessa E; Neumüller C; Palma G. 2003. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reproduction of Domestic Animals* 38:141-146.
- Sojka NJ & Jennings LL. 1970. Collection and utilization of cat semen for artificial insemination. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 156:1250-1251.

- Sojka NJ; Jennings LL; Hamner CE. 1970. Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). *Laboratory Animal Care* 20(2):198-204.
- Swanson WF. 1998. Curso de Extensão - Felinos selvagens. In: Biotécnicas reprodutivas e conservação. Setor de Ciências Biológicas, UFPR 5-10.
- Swanson WF; Johnson WE; Cambre RC; Citino SB; Quigley KB; Brousset DM; *et al.* 2003. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for *ex situ* conservation. *Zoo Biology* 22(5):421-441.
- Swanson WF; Wildt DE; Cambre RC; Citino SB; Quigley KB; Brousset D; Morais RN; Moreira N; O'brien SJ; Johnson WE. 1995. Reproductive survey of endemic felid species in Latin American zoos: male reproductive status and implications for conservation. In: Joint Conference American Association of Zoo Veterinarians Houston. Proceedings. Houston 10:374-80.
- Swanson WF & Brown JL. 2004. International Training Programs in Reproductive Sciences for Conservation of Latin American Felids. *Animal Reproduction Science* 82-83:21-34.
- Swanson WF; Howard JG; Roth TL; Brown JL; Alvarado T; Burton M; *et al.* 1996a. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *Journal of Reproduction and Fertility* 106(1):87-94.
- Swanson WF; Roth TL; Blumer E; Citino SB; Kenny D; Wildt DE. 1996b. Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Panthera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology* 45(1):241.
- Ström Holst B; Larsson B; Linde-Forsberg C; Rodriguez-Martinez H. 2000. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility* 119:201-206.
- Tardif S; Laforest JP; Cormier N; Bailey JL. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology* 52:447-459.

- Tebet MJ. 2004. Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato doméstico (*Felis catus*). Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” SP 145p.
- Tsutsui T; Hase M; Hori T; Komoriya K; Shimizu N; Nagakubo K; Kawakami E. 2000. Effect of addition of Orvus ES Paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *Journal of Veterinary Medical Science*. 62:537-538.
- Verstegen J; Iguer-Ouada M; Onclin K. 2002. Computed assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:140-179.
- Watson PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of the semen. In: Marshall's physiology of reproduction. 4th ed. Edinburgh Churchill Livingstone 2:747-869.
- Watson PF. 2000. The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Animal Reproduction Science* 60-61:481-492.
- Watson PF. 1979. The preservation of semen in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 1:283-350.
- Wildt DE; Brown JL; Bush M; Barone MA; Cooper KA; Grisham J; Howard JG. 1993. Reproductive status of cheetahs (*Acinonyx Jubatus*) in North American Zoos: the benefits of physiological surveys for strategic planning. *Zoo Biology*, 12(1):45-80.
- Wildt DE; Bush M; Howard JG; O'Brien SJ; Meltzer D; Van Dyk A; *et al.* 1983. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biology Reproduction* 29:1019-1025.
- Wildt DE; Bush M; Goodrowe KL; Packer C; Pusey AE; Brown JL; *et al.* 1987. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature* 329(6137):328-331.

- Wildt DE. 1989. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. *Zoo Biol. Supplem* 1:17-20.
- Wishart GJ. 1997. Quantitative aspects of sperm: egg interaction in chickens and turkeys. *Animal Reproduction Science* 48:81-92.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. In: Knobil E; Neill JD. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press 189-317.
- Zambelli D & Belluzzi S. 1998. Raccolta e valutazione del materiale seminale di gatto. *Praxis Veterinaria* 1:20-22.
- Zambelli D; Caneppele B; Catagnetti C; Belluzzi S. 2002. Cryopreservation of the cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reproduction in Domestic Animal* 37:310-3.
- Zavos PM. 1990. Hyposmotic swelling test (HOS)/functional integrity of sperm membranes. *Journal of Assisted Reproduction Technology* 2:215-216.

ARTIGO

Uso de sondas fluorescentes para avaliação seminal de ejaculado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como ferramenta de predição de fertilidade espermática.

RESUMO

Objetivou-se avaliar qualitativamente o ejaculado a fresco e descongelado de gato-do-mato-pequeno utilizando-se a combinação de sondas fluorescentes e testes de ligação *in vitro*. Foi utilizado um gato-do-mato-pequeno, que foi anestesiado por meio de protocolo anestésico de cloridrato de quetamina (10mg/kg) e xilazina (1,2 mg/kg). O sêmen foi coletado pelo uso de eletroejaculação e avaliado quanto aos aspectos físicos (cor, aspecto e volume), também foram realizados os testes a seguir: motilidade espermática, vigor espermático, concentração de espermatozoides no ejaculado, morfologia e teste hiposmótico. Posteriormente o sêmen foi criopreservado em palhetas francesas na concentração de 20×10^6 espermatozoides móveis/mL, em meio a base de TRIS citrato, 20% de gema de ovo e concentração final de 6% de glicerol e 0,5% de Equex. Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal foi usada a combinação de três sondas fluorescentes, iodeto de propídio, Hoescht 33342 e a aglutinina *Pisium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA). Para os testes de ligação de espermatozoides à zona pelúcida de ovócito de gata doméstica e à membrana perivitelina de ovos de galinha, o sêmen foi coincubado na concentração de $0,5 \times 10^6$ espermatozoides móveis/mL, em meio de manutenção TCM 199 modificado e mantido em estufa a 38 °C com pressão atmosférica de 5% de CO₂ durante uma hora. Os ejaculados obtidos apresentaram valores médios satisfatórios para vigor e motilidade (4,33; 80,0%, respectivamente), porém, diminuíram no sêmen descongelado ($p < 0,05$). O ejaculado a fresco apresentou-se com valores de patologias espermáticas abaixo do observado em outros estudos com sêmen a fresco de gato-do-mato (19%), no sêmen descongelado houve aumento de espermatozoides defeituosos ($p < 0,05$), devido exclusivamente ao aumento nos defeitos maiores. O percentual de células reativas ao teste hiposmótico foi menor ($p < 0,05$) no sêmen descongelado em relação ao sêmen a fresco (13,0% e 71,66%, respectivamente). A associação das sondas IP, H342 e FITC-PSA mostrou-se eficaz para a distinção de diferentes subpopulações de espermatozoides em um mesmo ejaculado, porém houve dificuldade em se

identificar a coloração pelo FITC-PSA em associação com o H342. Houve redução ($p < 0,05$) da população com membrana plasmática e acrossomal íntegras no sêmen descongelado em relação ao sêmen a fresco e aumento na população com membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra, que foi inversamente proporcional à motilidade espermática entre estes dois tratamentos. Em relação aos testes de ligação de espermatozoides a ovócitos heterólogos e a membranas perivitelina, tanto o sêmen a fresco quanto o descongelado de gato-do-mato-pequeno apresentou adesão aos substratos testados e ocorreu redução ($p < 0,05$) na quantidade de espermatozoides aderidos nos ovócitos e nas membranas no sêmen descongelado. As metodologias de avaliação qualitativa de associação de sondas fluorescentes e testes de ligação de espermatozoides a ovócitos e membrana perivitelina de ovo de galinha se mostraram úteis na avaliação de sêmen a fresco e descongelado de gato-do-mato-pequeno.

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

INTRODUÇÃO

A crescente degradação ambiental provocada pelos desmatamentos, construções de barragens, acidentes como derramamento de produtos químicos e queimadas têm como consequência direta a redução e a fragmentação dos inúmeros ecossistemas, levando uma grande diversidade de espécies a sofrer rápido declínio em seu número com consequente perda da diversidade genética de populações (Guimarães, 2002). Todos os felídeos estão no momento, ameaçados em algum grau e várias espécies são vistas como criticamente em perigo de extinção (IUCN, 2012).

O gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) está classificado como vulnerável pela IUCN. A conservação das espécies está intrinsecamente ligada à manutenção da variabilidade gênica. Quando uma população é isolada geograficamente e fica sujeita à uniformidade gênica, vários fatores se aliam para desencadear o processo de extinção. Entre estes fatores estão a maior suscetibilidade a doenças, o aumento de anormalidades espermatógenas e diminuição da fertilidade, o desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos afetando a espermatogênese, a ovulação e a morbidade e mortalidade perinatal (Wildt *et al.*, 1987; Munson *et al.*; 1996; Eizirik *et al.*, 2001).

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

A biotecnologia da reprodução ou reprodução assistida tem um potencial de impacto significativo na conservação de pequenos felídeos selvagens (Pope, 2000). A aplicação desta tecnologia demonstra-se principalmente no uso da inseminação artificial, transferência de embriões, fertilização *in vitro* e criopreservação de gametas (Lopes, 2002).

O processo de criopreservação inclui várias etapas, desde a coleta, envasamento e diluição da amostra para o congelamento até o descongelamento e

inseminação, cada uma delas pode provocar danos aos espermatozóides e conseqüentemente reduzir por volta de 50% o percentual de espermatozóides capazes de fertilizar um ovócito (Howard *et al.*, 1991; Johnston *et al.*, 1991; Januskauskas *et al.*, 1996; Watson, 2000; Luvoni *et al.*, 2003; Hallap *et al.*, 2006). A perda da capacidade fertilizante do sêmen descongelado nos felinos se deve em parte a uma queda acentuada na qualidade do sêmen devido, principalmente, a danos causados nas membranas plasmáticas e acrossomais (Pukazhenthil *et al.*, 1999; Leibo & Songsasen, 2002), uma vez que estas estruturas são sensíveis ao processo de congelamento/descongelamento.

A fim de se determinar os danos gerados após o descongelamento, causados às diferentes estruturas dos espermatozóides, as quais, são essenciais ao processo de fecundação de ovócitos, são utilizados diversos testes *in vitro* que muitas vezes são subjetivos e insuficientes para predizer a real capacidade de fertilização dos espermatozoides avaliados. Portanto, testes complementares são necessários em programas de reprodução assistida para orientar a metodologia e aumentar índices reprodutivos a partir de sêmen descongelado. Nesse contexto, a utilização de sondas fluorescentes, que apresentam tropismo por sítios específicos nas células, são ferramentas que permitem a avaliação do grau de comprometimento estrutural do espermatozóide (Harrison & Vickers, 1990).

Outro teste utilizado é o ensaio de ligação com ovócitos heterólogos, que permitem uma avaliação direta da capacidade de ligação do sêmen, porém este depende da qualidade ovocitária e de um grande número de doadoras para a obtenção de ovócitos, o que torna a prática mais onerosa e com resultados influenciados por características relativas às fêmeas. A fim de se contornar as desvantagens citadas foi sugerido o uso da membrana perivitelina de ovo de galinha a qual permite a padronização do substrato ligante para diversas amostras a serem testadas, além de ser um material de fácil obtenção e manuseio. O ensaio de ligação de espermatozoides à membrana perivitelina apresentou-se efetivo em mamíferos domésticos (Santos, 2009, Amorim, 2008), no entanto não há relatos de utilização para gatos-do-mato-pequeno.

O autor do estudo objetivou avaliar o uso de sondas fluorescentes e testes de ligação de espermatozoides na qualificação de sêmen de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) a fresco e descongelado.

MATERIAL E MÉTODOS

6. Animais

Foi utilizado um indivíduo macho adulto de gato-do-mato-pequeno de aproximadamente quatro anos de idade. O animal é mantido no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV) localização geográfica (20°45'15,92''S; 42°52'22,07''O). O animal permanece cativo em recinto isolado de 2,5 m x 3,0 m de área aberta e 1,5 m x 1,0 m de abrigo protegido o qual serve como área de escape para o animal. Recebe como base alimentar uma dieta de presas vivas: ratos (*Mus musculus*), porquinhos da índia (*Cavia porcellus*) três vezes por semana e vísceras bovinas, suínas e carcaças de frangos abatidos quatro vezes por semana, além de água *ad libitum*. O estudo contou com autorização do Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade - ICMBio - (Protocolo: 29289) e da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa CEUA-UFV sob Protocolo nº 344/2012.

7. Coleta e Processamento do Sêmen

Foram realizadas quatro coletas de sêmen com intervalo mínimo de duas semanas, para reduzir os efeitos prejudiciais da anestesia e o estresse pela contenção do animal. O sêmen foi coletado por eletroejaculação conforme Ávila (2009). O animal foi contido fisicamente com a utilização de puçá e luvas de raspa de couro, para então receber a aplicação de anestésico por via intramuscular. O protocolo anestésico usado foi a associação de cloridrato de quetamina (10 mg/kg, Dopalen®, Vetbrands, SP-Brasil) e cloridrato de xilazina (1,2 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands, SP-Brasil). O animal foi monitorado por Médico Veterinário por meio da utilização de monitor multiparamétrico o qual forneceu os parâmetros vitais do animal durante todo o procedimento. Após a realização da coleta de sêmen a anestesia foi parcialmente revertida utilizando ioimbina na dose de 0,5 mg/kg, via endovenosa (Citopharma, local), o que propiciou a recuperação pós-anestésica rápida e segura.

Após a contenção química, foi realizado o exame andrológico, para o qual foi avaliada a consistência testicular e as características das espículas penianas.

O sêmen foi coletado com auxílio de um aparelho de eletroejaculação (Atojac®, Neovet, Brasil), equipado com um transdutor retal, de 4 cm de diâmetro, com dois eletrodos circulares. O transdutor foi lubrificado e uma extensão de aproximadamente 10 cm foi introduzida no reto do animal, sob leve pressão e com os eletrodos voltados ventralmente. O pênis foi exposto e aproximado a um tubo graduado de 1,5 mL (tipo Eppendorf) previamente aquecido à temperatura de 38 °C, o qual era substituído a cada série de estímulos ou a cada momento em que o animal ejaculava.

Para o delineamento experimental foi usado sêmen a fresco e descongelado nos quais foi comparada a avaliação espermática de rotina (vigor, motilidade, teste hiposmótico e patologia), para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal foram utilizadas sondas fluorescentes. Foram também realizados testes de ligação de espermatozoide em zona pelúcida de ovócitos de gata doméstica e em membrana perivitelina de ovo de galinha.

8. Avaliação Espermática

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

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

Para o cálculo da concentração (espermatozoides/mL) o sêmen foi diluído em água destilada na proporção 1:100 e uma alíquota desta diluição foi depositada em Câmara de Neubauer espelhada, para contagem dos espermatozoides em microscópio óptico (400x). A concentração (C) foi determinada pela fórmula ($C = \text{número de espermatozoides} \times 5 \times 10^6$). Para calcular a concentração de espermatozoides móveis (CM) por mL de ejaculado, multiplicou-se a concentração pela motilidade espermática e para calcular o total de espermatozoides por ejaculado (TE) multiplicou-se a concentração pelo volume. Nas análises espermáticas subsequentes, o sêmen foi diluído

para 40×10^6 espermatozoides móveis/mL em meio à base de TRIS-citrato com 20% de gema de ovo e sem glicerol.

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

Para o teste hiposmótico uma alíquota de 5µL de sêmen foi adicionada a 20µL de solução hiposmótica contendo sacarose e H₂O Miliq, a 100 mOsmol/Kg. Após 30 min de incubação a 37 °C foi adicionado 0,5 mL do fixador Karnovsky. A contagem foi realizada em microscópio de contraste de fase em preparação úmida, sendo contadas 200 células no aumento de 1.000 vezes. Foram consideradas como reativas ao teste as células com enrolamento ou dobramento de cauda. O valor bruto de espermatozoides reativos foi corrigido excluindo-se da população total a parcela com as mesmas características contabilizadas no teste de patologia.

Para a avaliação de integridade das membranas plasmática e acrossomal foi utilizada a associação de três sondas fluorescentes, o iodeto de propídio (IP), o Hoechst 33342 (H342) e aglutinina *Pisium sativum* conjugada com isotiocionato de fluorocéina (FITC-PSA). Para isso, foram adicionados 2 µL de IP (0,5 mg/mL em DPBS), 10 µL de Hoechst 33342 (25 µg/mL em DPBS) e 60 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS) em microtubo contendo 10 µL do sêmen. O sêmen foi incubado por 8 minutos a 37 °C, mantido em ambiente escuro, e uma gota foi visualizada em microscópio de epifluorescência com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm) (Nikon) nos aumentos de 400 e 1.000 vezes. Foram contabilizadas 200 células por análise e os resultados expressos em número de células coradas. Com o uso desta combinação de fluorocromos foi possível a distinção de quatro subpopulações de espermatozoides conforme descrito por Csermak Jr.(2011):

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

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

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

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

9. Teste de ligação de espermatozoides à zona pelúcida de ovócito de gata doméstica

Os ovários foram obtidos de ovariectomias eletivas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa e foram mantidos em soro fisiológico e congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem processados. Para obtenção dos ovócitos, os ovários foram descongelados a 37°C e posteriormente seccionados com lâmina de bisturi. Este procedimento foi realizado no interior de uma capela de fluxo laminar em placa de Petri contendo meio TALP HEPES modificado (Costa, 1997). Usando um microscópio estereoscópico os ovócitos foram recuperados e transferidos para uma segunda placa contendo o mesmo meio, onde foram desnudados conforme técnica desenvolvida por Costa (1994).

Os ovócitos coletados foram colocados em dois poços de placas de incubação os quais continham de 15 a 20 ovócitos com 400 μL de meio de manutenção TCM 199 modificado (Costa, 1997). As placas contendo ovócitos foram levadas para incubação em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com pressão atmosférica de 5% de CO_2 por 30 minutos, objetivando-se a estabilização das células. Após esse período um dos poços foi preenchido com 20 μL de sêmen na concentração de $0,5 \times 10^6$ espermatozoides móveis/mL e o outro poço recebeu a mesma quantidade e concentração espermática, porém com espermatozoides mortos após três sucessivas sequências de choques térmico por imersão em nitrogênio líquido e descongelamento subsequente (Stronhost, 2000).

Após 30 minutos de coincubação ovócitos/espermatozoides, foram adicionados aos poços 200 μL da sonda fluorescente Hoechst 33342 e realizada a homogeneização por meio de movimentos circulares. Aos 50 minutos de coincubação foram adicionados 20 μL de iodeto de írio e novamente foi feita a homogeneização. Estes

procedimentos foram realizados em ambiente escuro e sob placa aquecedora a 37 °C. Após 60 minutos de coincubação, os ovócitos foram lavados quatro vezes em meio Talp-Hepes. Em seguida foi efetuada a montagem das lâminas de vidro, nas quais eram coladas fitas dupla-face 3M perfuradas com bisturi circular (punch) para a formação de poços de 4 mm de diâmetro nos quais os ovócitos eram posicionados para então proceder à visualização em microscópio. Foi utilizado microscópio de epifluorescência (Nikon) equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm), com um aumento de 400x. Todas as células espermáticas ligadas à zona pelúcida foram contadas.

10. Ensaio de ligação de espermatozóides em membrana perivitelínica de ovos de galinhas

Todos os ovos utilizados na experimentação eram de postura realizada no dia da experimentação e não embrionados. A preparação da membrana perivitelina teve início na separação entre a clara e a gema do ovo. Após este procedimento, a gema intacta foi acondicionada em placa de Petri e seccionada com uma tesoura oftálmica. Por este orifício parte da gema foi succionada utilizando-se seringa de 10 mL, para então injetar soro fisiológico até a completa remoção de gema, restando somente a membrana totalmente transparente. A membrana limpa foi então transferida para outra placa de Petri que continha meio TALP HEPES modificado (Costa, 1997), onde foi feita uma última lavagem com meio TALP HEPES e realizada a montagem da membrana em um suporte de silicone. A superfície interna da membrana foi acondicionada sobre halo de silicone vazado com diâmetro interno de 4 mm e diâmetro externo de 8 mm, a superfície de membrana que ultrapassava os limites do halo era cortada com a utilização de tesoura oftálmica e então realizava-se o encaixe perfeito de halo de diâmetro interno de 8 mm, o que mantinha a membrana fixa e com a área a ser lida totalmente exposta e devidamente esticada (Figura 1). A leitura foi feita na área total exposta. Os procedimentos de incubação e coloração com sondas fluorescentes procederam como descrito para o ensaio de ligação com ovócitos.

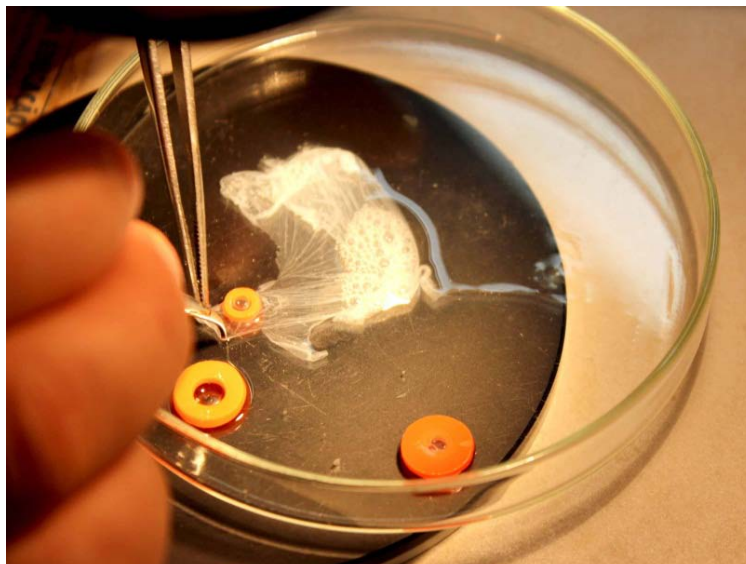


Figura 1. Preparo da membrana perivitelina de ovo de galinha em suporte de silicone para ensaio de ligação com espermatozoides de gato-do-mato-pequeno.

11. Criopreservação espermática

Para a criopreservação, amostras do sêmen na concentração de 40×10^6 espermatozoides móveis/mL foi rediluído em meio à base de TRIS citrato com glicerol a 12% e Equex a 1% (1:1), resultando em uma concentração final de 6% glicerol, 0,5% de Equex e 20×10^6 espermatozoides móveis/mL. As amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,25 mL. Para obter uma taxa de resfriamento de $-0,55 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, foi utilizada a metodologia descrita por Bueno *et al.* (2001) modificado. Logo após, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido. Para isso as palhetas eram dispostas horizontalmente por 15 min acima de uma lâmina de nitrogênio líquido de 3 cm de altura, dentro de caixa térmica fechada. As palhetas distavam 10 cm da lamina de nitrogênio líquido durante o período de congelamento, logo após eram acondicionadas em botijão de congelamento. Após uma semana as amostras de sêmen foram descongeladas por imersão em água a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por sete segundos e em seguida foram avaliados os espermatozoides da mesma forma que o sêmen a fresco.

12. Análise estatística

Para avaliar os dados obtidos na análise de sêmen entre e dentre os tratamentos congelado e descongelado foi utilizado o teste de verificação de normalidade de Lilliefors, teste de homogeneidade de Cochran e Bartlett, análise de variância e teste F a 5% de significância. As variáveis de ligação de espermatozoides foram analisadas pelo

teste de Wilcoxon de análise de variância não paramétrica. As correlações entre e dentre tratamentos fresco e descongelado foram obtidas por Correlação Simples de Pearson. As análises foram realizadas com uso do software SAEG 9.1 (UFV, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O animal utilizado apresentava idade aproximada de quatro anos e peso corporal de 2,5 kg, peso este compatível com o registrado para gatos do mato pequenos (*Leopardus tigrinus*) adultos (Oliveira & Cassaro, 2005). Desta forma foi considerado maduro sexualmente, uma vez que a maturidade sexual em felinos está correlacionada com o peso corporal adulto (Gruffydd-Jones, 1993).

A avaliação andrológica do animal utilizado revelou consistência testicular dentro do padrão de normalidade funcional, assim como presença de espículas córneas penianas abundantes e bem formadas. Variações de flacidez na consistência testicular podem estar relacionadas às degenerações testiculares Wildt & Roth (1997), as quais podem resultar em ejaculados com baixa concentração espermática e elevada taxa de espermatozoides morfologicamente anormais, sendo que em casos mais graves pode ocorrer azospermia (Nascimento & Santos, 2003). A presença das espículas penianas é uma característica andrógeno-dependente, e por isso utilizada como preditora da capacidade androgênica em felinos. São responsáveis pelo estímulo neuroendócrino na fêmea necessário para o desencadeamento da ovulação durante a cópula (Johnston *et al.*, 2001).

O protocolo de eletroejaculação utilizado mostrou-se eficiente, uma vez que o animal respondeu aos estímulos com a distensão simétrica dos membros pélvicos, ereção e ejaculação. Os ejaculados viáveis foram obtidos na maioria das vezes na primeira série de estímulos, apresentando coloração esbranquiçada com volume médio de 0,2 mL. Embora a contaminação por urina seja bastante relatada nas coletas de sêmen em felinos, principalmente associada à aplicação de estímulos com altas voltagens e o posicionamento mais cranial da probe (Pineda *et al.*, 1984; Howard, 1993), no presente experimento não foram registradas amostras contaminadas.

Os valores de volume, concentração espermática e espermatozoides totais obtidos nos ejaculados testados são sumarizados na Tabela 1. As médias do volume do ejaculado (0,2 mL), concentração espermática ($318,3 \times 10^6$ spz/mL) e espermatozoides totais ejaculados ($62,4 \times 10^6$ spz) obtidas no presente experimento foram próximas aos valores registrados por Tebet (2004) (0,16 mL, $269,1 \times 10^6$ spz/mL e $43,06 \times 10^6$ spz) e Baudi (2005) (0,35 mL, $242,8 \times 10^6$ spz/mL e $56,6 \times 10^6$ spz). Porém valores

inferiores foram observados por Swanson *et al.* (1995) (0,11 mL, $78,5 \times 10^6$ sptz/mL e $8,63 \times 10^6$ sptz) e Morais *et al.* (2002) registrou valores superiores de concentração e espermatozoides totais (0,3 mL, $411,9 \times 10^6$ sptz/mL e $123,3 \times 10^6$ sptz). Apesar da variação observada na literatura, a constância da obtenção de amostras de sêmen de gato-do-mato-pequeno aponta para uma pequena quantidade de espermatozoides, o que dificulta de sobremaneira os esforços em reprodução assistida nesta espécie.

Tabela 1. Valores de volume (Vol), concentração espermática (CE) e o número de espermatozoides totais por ejaculado (sptz-totais) em três ejaculados obtidos em um indivíduo de *Leopardus tigrinus*.

	Vol (mL)	CE ($\times 10^6$ sptz/mL)	Sptz/totais ($\times 10^6$)
Coleta 1	0,180	235	42,30
Coleta 2	0,145	375	54,37
Coleta 3	0,262	345	90,39
Média	0,195 \pm 0,060	318,33 \pm 73,71	62,35 \pm 25,02

Embora apontado como subjetivo e sujeita a variações dependentes da experiência do observador, os valores de vigor e motilidade espermáticos representam bons indicadores da qualidade do sêmen (Thomassen *et al.*, 2006). A movimentação do espermatozóide é uma manifestação da integridade funcional dos seus componentes e elevada correlação com a taxa de fertilidade, normalidade morfológica e integridade da membrana espermática são relatados em humanos e carnívoros (Smith *et al.*, 1977; Oettlé, 1993; Peña-Martinez, 2003; Thomassen *et al.*, 2006). A média do vigor e da motilidade espermática obtida no sêmen a fresco no presente experimento se mostraram de boa qualidade (4,33; 80,0%, respectivamente), porém, uma queda ($P < 0,05$) nos valores destes parâmetros foi observada no sêmen após o descongelamento (Tabela 2).

Tabela 2. Média \pm desvio padrão (coeficiente de variação) dos parâmetros qualitativos do sêmen a fresco e descongelado de gato-do-mato-pequeno, número de espermatozoides ligados a ovócitos heterólogos de gatas domésticas e membrana perivitelina de ovos de galinha.

	Sêmen a fresco	Sêmen descongelado
Vig	4,33 \pm 0,28 ^a (6,46)	2,5 \pm 0,50 ^b (20,00)
Mot	80,00 \pm 0,00 ^a (0,0)	33,33 \pm 5,77 ^b (17,31)
Pato	19,00 \pm 2,64 ^a (13,89)	47,66 \pm 4,16 ^b (8,72)
DM	5,66 \pm 3,05 ^a (53,88)	36,33 \pm 7,09 ^b (19,51)
Dm	13,33 \pm 2,51 ^a (18,82)	11,33 \pm 6,65 ^a (58,69)
HOST	71,66 \pm 7,23 ^a (10,08)	13,00 \pm 6,72 ^b (51,69)
LI	24,16 \pm 11,87 ^a (49,13)	74,00 \pm 3,60 ^b (4,86)
II	69,33 \pm 14,46 ^a (20,85)	15,66 \pm 5,50 ^b (35,12)
LL	6,50 \pm 3,27 ^a (50,30)	9,66 \pm 4,50 ^b (46,58)
IL	0 \pm 0 (0)	0,66 \pm 1,15 (174,24)
TSO	33,16 \pm 25,84 ^a (77,91)	7,33 \pm 5,44 ^b (71,95)
TSM	67,57 \pm 48,62 ^a (74,31)	15,60 \pm 10,67 ^b (68,45)

Vig: Vigor espermático / Mot: Motilidade espermática / Pato: Patologias / DM: Defeito maiores / Dm: Defeitos menores / HOST: Teste hiposmótico / LI: Membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro / II: Membrana plasmática e acrossomal íntegros / LL: Membrana plasmática e acrossomal lesados / IL: Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada / TSO: Total de espermatozoides ligados na zona pelúcida de ovócitos de gata / TSM: Total de espermatozoides ligados na membrana perivitelina de ovo de galinha.

A quantificação dos níveis de espermatozoides defeituosos em um ejaculado é um parâmetro relevante na qualificação da viabilidade do sêmen, uma vez que alguns defeitos representam total impossibilidade ao espermatozoide em fertilizar o ovócito. Ou seja, dificilmente espermatozoides com defeitos maiores, danos acrossomais ou cauda fortemente dobrada, podem participar da fertilização (Wildt *et al.*, 1987). No entanto, a etiologia das anormalidades específicas assim como seu impacto sobre a fertilidade ainda são controversos (Howard *et al.*, 1986; Wildt *et al.*, 1987).

Espécies silvestres comumente produzem mais de 60% de espermatozoides anormais por ejaculado, um achado relacionado com a redução na variabilidade genética de uma determinada população ou mesmo de toda a espécie (Wildt *et al.*, 1983; Wildt *et*

al., 1992; Howard, 1993). No presente trabalho o gato-do-mato-pequeno utilizado apresentou cerca de 19% de espermatozoides com patologias no sêmen a fresco (Tabela 2), valores relativamente baixos no percentual de espermatozoides defeituosos também foram relatados por Baudi (2005), porém, Swanson *et al.* (1995), Morais *et al.* (2002) e Tebet (2004) registraram valores próximos a 50% no nível de espermatozoides defeituosos nesta espécie.

As patologias espermáticas podem ser classificadas de acordo com a região de origem, como: defeitos primários, aqueles que ocorrem durante o processo espermato gênico e defeitos secundários, que são consequência do processo de maturação e transporte no epidídimo. As patologias também podem ser descritas em relação à capacidade fertilizante como defeitos maiores - correlacionados com infertilidade - e defeitos menores - não correlacionados com infertilidade - (Blom, 1973; Wildt *et al.*, 1983; Howard *et al.*, 1986). Axnér & Linde-Forsberg (2007) observaram que somente as patologias de cabeça foram relacionadas com baixa fertilidade. Howard *et al.* (1991) observaram que elevadas concentrações de patologias espermáticas causam efeito negativo na interação de gametas *in vitro*, porém, ainda são poucos os estudos que correlacionam morfologias espermáticas específicas com fertilidade em felinos (Donoghue *et al.*, 1992; Wildt *et al.*, 1993; Axnér *et al.*, 1996, Axnér *et al.*, 1997, Axnér *et al.*, 1998).

Em relação ao sêmen a fresco de gato-do-mato-pequeno, no descongelamento foi observado um aumento ($P < 0,05$) no percentual total de espermatozoides defeituosos, sendo que este aumento foi devido exclusivamente aos defeitos maiores (Tabela 2). Assim, o protocolo de criopreservação utilizado contribuiu com o aumento de defeitos ligados a infertilidade.

A funcionalidade normal da membrana é essencial para que ocorra a fertilização sendo, portanto um importante parâmetro seminal a ser avaliado na definição de protocolos de reprodução assistida (Araujo, 2012). O teste hiposmótico (HOST) nos permite obter uma avaliação simples da integridade da membrana plasmática, uma vez que consiste na reação de enrolamento/dobramento da cauda de células com membrana íntegra, frente a meios com baixa osmolaridade. No presente trabalho, o percentual de células reativas ao HOST foi menor ($p < 0,05$) no sêmen descongelado em relação ao sêmen a fresco (Tabela 2). Sugerindo que o processo de criopreservação afeta

diretamente a integridade da membrana espermática. Da mesma forma, a partir da coloração com sondas fluorescentes foi possível observar que a subpopulação registrada com membrana plasmática lesionada após o descongelamento (LI), aumentou ($p < 0,05$) em relação ao sêmen a fresco, na mesma proporção em que houve redução da subpopulação de células com membrana íntegra (II) (Tabela 2). O aumento registrado, nos testes hiposmótico e de sondas fluorescentes, relacionados a células com membrana plasmática lesionada em decorrência da criopreservação, foi proporcional à queda registrada na motilidade espermática (Tabela 2).

Embora a associação das sondas iodeto de propídio e Hoechst 33342 tenha se mostrado eficaz para a distinção de espermatozoides com membranas plasmáticas íntegras, houve dificuldade em se identificar a coloração pelo FITC-PSA no sêmen de gato-do-mato-pequeno. Esta característica também foi observada em sêmen de jagatirica (Araujo, 2012), possivelmente devido ao reduzido tamanho do acrossoma de felinos (Donoghue *et al.*, 1992; Howard, 1993).

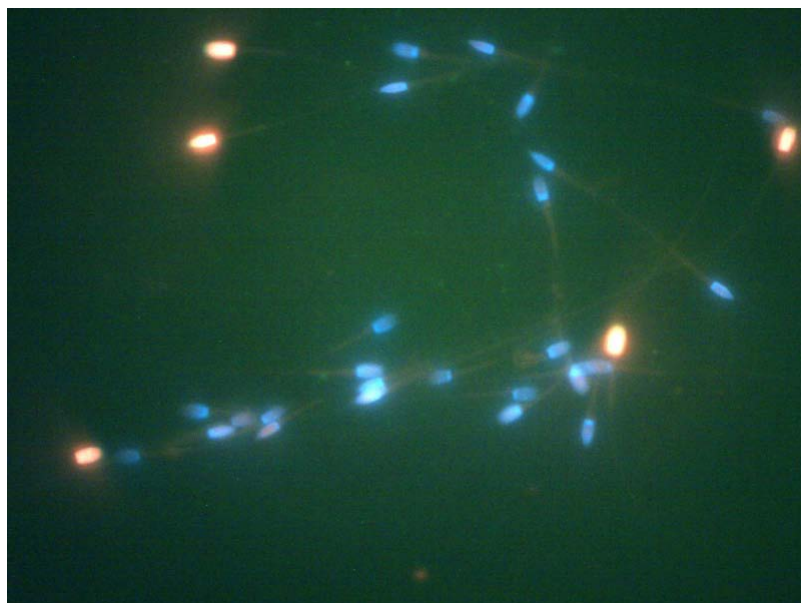


Figura 2. Espermatozoides de gato-do-mato-pequeno corados com as sondas fluorescentes Hoechst 33342 (Azuis) e Iodeto de propídeo (Vermelhos), no aumento de 1000x.

A lesão constatada na membrana plasmática de espermatozoides submetidos ao congelamento é em parte devido a uma série de modificações estruturais nas membranas plasmáticas e acrossomal devido à redistribuição dos fosfolipídeos e a remoção do colesterol (Langlais & Roberts, 1985; Lin & Kan, 1996). Devido à comprovada

especificidade e confiabilidade da combinação das sondas fluorescentes utilizadas para avaliar a integridade de membrana plasmática, houve a demonstração da integridade da membrana plasmática em espermatozoides de gato-do-mato-pequeno (Figura 2). A combinação de sondas foi útil ainda na aferição da confiabilidade do teste hiposmótico, uma vez que houve estreita afinidade com o mesmo. Assim, o teste hiposmótico apresentou uma forte correlação positiva (0,99)($p>0,05$) com a subpopulação II no sêmen a fresco, no mesmo momento em que houve uma forte correlação negativa com a subpopulação LI (0,99) ($p>0,05$).

A ligação entre o ovócito e o espermatozoide envolve o reconhecimento dos receptores de espermatozoides presentes na zona pelúcida do ovócito e as proteínas de ligação correspondentes na superfície espermática (Rath *et al.*, 2005; Sinowatz *et al.*, 2003). A fertilização *in vitro* é uma ferramenta valiosa para se avaliar a função do espermatozoide e para estudar a interação de gametas nos felinos domésticos e selvagens (Wildt *et al.*, 1992). Em felinos, testes funcionais podem ser realizados com o objetivo de avaliar a capacidade do espermatozoide em penetrar o ovócito, através do ensaio de penetração em zona pelúcida de ovócitos de gatas domésticas (Andrews *et al.*, 1992). Outra proposição recente é o ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovos de galinhas em substituição a ovócitos heterólogos (Araujo, 2012). No presente experimento, tanto o sêmen a fresco quanto o descongelado de gato-do-mato-pequeno foram capazes de se ligar ao ovócito de gatas domésticas (Figura 3) e à membrana perivitelina de ovos de galinha. Em ambos os casos foram registradas reduções ($p>0,05$) na quantidade de espermatozoides ligados entre os tratamentos, a fresco e descongelado (Tabela 2). Com o uso de espermatozoides mortos de gato-do-mato-pequeno, não foram registradas ligações consideráveis sobre a zona pelúcida de gatas domésticas ou membrana perivitelina de ovos de galinha.

A zona pelúcida é a maior barreira seletiva para a entrada do espermatozoide no ovócito, desta forma, os resultados dos ensaios de ligação espermática podem sugerir a capacidade fertilizante de uma amostra. Entretanto, diferenças entre tratamentos ou indivíduos podem apenas ser detectadas após avaliação de um número relativamente grande de ovócitos, o que pode limitar o uso destes ensaios (Waberski *et al.*, 2005), principalmente ao se tratar de animais silvestres. Em jaguatiricas também foram registrados redução na quantidade de espermatozoides ligados à zona pelúcida

heteróloga após o descongelamento (Araujo, 2012), porém, o mesmo não foi observado por Donoghue *et al.*, (1992) para sêmen de tigre (*Panthera tigris*).

Inúmeras variáveis podem afetar os ensaios de ligação espermática, uma delas está relacionada à qualidade dos ovócitos, a qual pode variar com as condições nutricionais e fase reprodutiva da doadora e mesmo com os critérios de seleção dos ovócitos e sistemas de cultivo (Baudi, 2005). Dentre as alternativas para estas variáveis foi aventado o uso de hemizonas pelúcidas, com metades idênticas utilizadas entre os tratamentos (Baudi, 2005), porém, com praticidade questionável. Neste sentido, os ensaios de ligação espermática em membrana perivitelina de ovo de galinha apresentam uma alternativa promissora (Barbato, 1998; Santos, 2009; Csermak Jr, 2011; Araujo, 2012).

No presente estudo os espermatozoides de gato-do-mato-pequeno foram capazes de se ligar à membrana perivitelina de ovo de galinha em ambos os tratamentos, com redução ($p > 0,05$) do número de espermatozoides ligados por área circular de 4 mm de diâmetro de membrana perivitelina, após o descongelamento (Tabela 2), ou seja, o processo de criopreservação utilizado foi deletério para a capacidade de ligação dos espermatozoides. Da mesma forma Barbato *et al.* (1998), em trabalho com sêmen de galo, observaram diminuição do percentual de espermatozoides ligados e também atribuíram esta queda aos danos celulares causados pelo processo de congelamento. O mesmo não foi observado após o descongelamento do sêmen em jaguatiricas (Araujo, 2012) e em cão doméstico, neste estudo houve diferença estatística para ligados vivos Csermak Jr. (2011), em ambos os casos os autores sugerem que o pequeno número de amostras avaliadas não foram suficientes para uma acurácia do teste, sendo necessário novas experimentações.

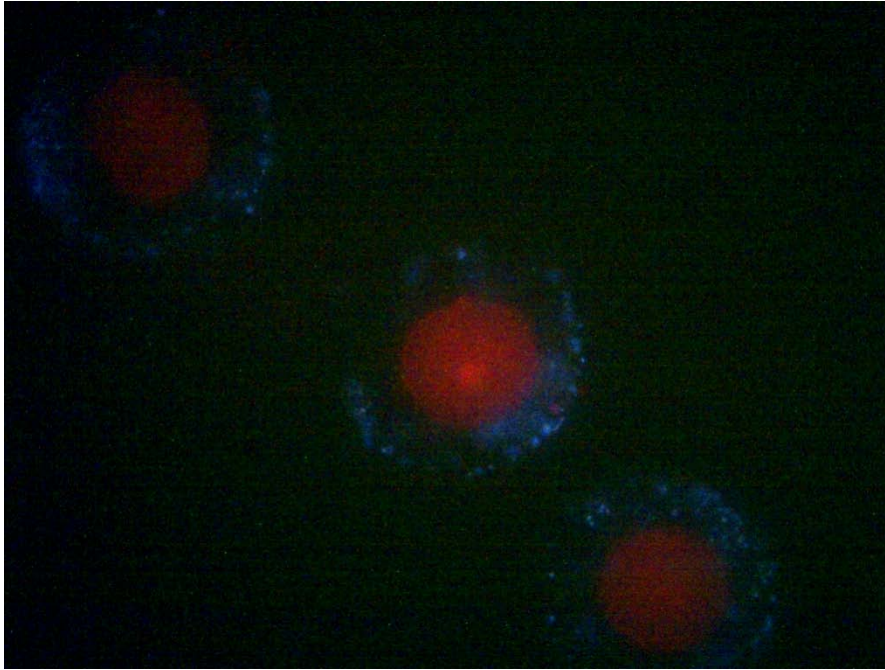


Figura 3. Espermatozoides de gato-do-mato-pequeno corados em azul com H342, ligados à zona pelúcida de ovócitos desnudos de gata doméstica corados de vermelho pelo iodeto de propídio, no aumento de 200x.

CONCLUSÕES

A combinação das sondas fluorescentes iodeto de propídio e Hoechst 33342 foi eficaz na avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de gato-do-mato-pequeno e também na confirmação do teste hiposmótico como preditor de integridade da membrana plasmática de espermatozoides. Houve, no entanto, dificuldade em se identificar as subpopulações coradas com a sonda FITC-PSA, dado o reduzido tamanho do acrossoma desta espécie.

Os testes de ligação de gametas utilizando ovócitos de gata doméstica e membrana perivitelina de ovo de galinha se mostraram eficazes na diferenciação da qualidade espermática de sêmen a fresco e descongelado de gato-do-mato-pequeno. O mecanismo utilizado para suporte das membranas se mostrou eficaz em todas as etapas de processamento envolvido, no entanto mais estudos com membrana perivitelina utilizando-se outros indivíduos da espécie são necessários para a efetiva validação deste teste de ligação para *Leopardus tigrinus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim EAM. 2008. Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen, Tese de Doutorado Universidade Federal de Viçosa MG. 174p.
- Andrabi SMH & Maxwell WMC. 2007. A review of reproductive biotechnologies for conservation of endangered species. *Animal Reproduction Science* 99(3-4):223-243.
- Andrews JC; Howard JG; Bavister BD; Wildt DE. 1992. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with salt-stored zona pellucida penetration assay. *Molecular Reproduction and Development* 31:200-201.
- Araújo GE. 2012. Uso de sondas fluorescentes e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e a membrana perivitelínica de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa MG, 64p.
- Ávila EC. 2009. Avaliação andrológica e criopreservação do sêmen de jaguatirica (*Leopardus pardalis*, LINNAEUS, 1758). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa MG. 78p.
- Axnér E & Linde-Forsberg C. 2007. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: A retrospective study. *Reproduction in Domestic Animals* 42(3):282-291.
- Axnér E; Ström B; Linde-Forsberg C. 1997. Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology* 47(4):929-934.
- Axnér E; Ström B; Linde-Forsberg C; Gustavsson I; Lindblad K; Wallgren M. 1996. Reproductive disorders in 10 domestic male cats. *Journal of Small Animal Practice* 37(8):394-401.

- Axnér E; Ström-Holst B; Linde-Forsberg C. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50(6):973-979.
- Barbato GF; Cramer PG; Hammerstedt RH. 1998. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biology of Reproduction* 58: 686-699.
- Baudi DLK. 2005. Efeito de dois métodos de resfriamento sobre a função espermática *in vitro* de sêmen criopreservado de felinos (*Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e *Felis catus*), avaliada através de ensaio competitivo de ligação em ovócitos de gata doméstica (*Felis catus*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná PR 76p.
- Blom E. 1973. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Veterinaermed* 25:383-391.
- Bueno R; Costa EP; Guimarães JD; Valentim FM. 2001. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães-Efeito do meio diluidor. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53(3).
- CBRA-Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1998. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (2Ed.), Belo Horizonte, Brasil. 65p.
- Celeghini ECC. 2005. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia SP 186 p.
- Comizzoli P; Mermillod P; Mauget R. 2000. Reproductive Biotechnology for Endangered Mammalian Species. *Reproduction Nutrition Development* 40:493-504.
- Costa EP da. 1994. Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos bovinos *in vitro*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais MG 155p.

- Costa, E. P.; Vale filho, Vicente Ribeiro Do ; Nogueira, J. C. ; Ferreira, A. M. ; Costa, Aurea Helena Assis da ; Guimarães, José Domingos. 1997 . Cultivo "in vitro" de ovócitos bovinos em diferentes sistemas. I - Efeito na maturação nuclear. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia **JCR**, Belo Horizonte, v. 49, n. 5, p. 551-560..
- Csermak ACJ. 2011. Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozóide do cão *Canis lupus familiaris* à membrana perivitelina do ovo de galinha *Gallus gallus* como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa MG, 72 p.
- Donoghue AM; Johnston LA; Seal US; Armstrong DL; Simmons LG; Gross T; *et al.* 1992. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs *in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility 96:555-564.
- Eizirik E; Kim JH; Raymond MM; Grawshaw Jr PG; O'brien SJ; Johnson WE. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). Molecular Ecology 10(1):65-79.
- Gruffydd-Jones TJ. 1993. Disorders of the reproductive system. In: Willis J & Wolf A. Handbook of Feline Medicine. Oxford, UK: Pergamon Press 213-222.
- Guimarães MABV. 2002. Biotecnologia aplicada aos animais silvestres: aspectos éticos e conservacionistas. Revista Brasileira de Reprodução Animal 26(2):58-61.
- Hallap T; Nagy S; Jaakma U; Johannisson A; Rodriguez- Martine H. 2006. Usefulness of a triple fluorochrome combination merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from estonian holstein ai bulls. Theriogenology 65:1122-1136.
- Harrison RAP; & Vickers SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility 88:343-352.
- Howard JG. 1993. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In: Fowler ME. Zoo and wild animal medicine Philadelphia: WB Saunders.3ed. 390-399.

- Howard JG; Bush M; Wildt DE. 1986. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow D (ed), *Current Therapy in Theriogenology II*. Philadelphia: W.B. Saunders 1047-1053.
- Howard JG; Bush M; Wildt DE. 1991. Teratospermia in Domestic Cats Compromises Penetration of Zona-Free Hamster Ova and Cat Zonae Pellucidae. *Journal of Andrology* 12(1):36-45.
- IUCN-International Union For Nature Conservation. 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 02 July 2012.
- Januskauskas A; Haard MG; Haard MC Soderquist L; Lundeheim N; Rodriguez-Martinez H. 1996. Estimation of sperm viability in frozen-thawed semen from Swedish A.I. Bulls. *Zentralbl Veterinarmed A* 43(5):281-287.
- Johnston LA; Donoghue AM; O'brien SJ; Wildt DE. 1991. Rescue and maturation in vitro of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. *Biology of Reproduction* 45(6):898-906.
- Johnston SD; Root kustritz MV; Olson PNS. 2001. Section IV: The tom. In: *Canine and feline Theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders 497-520.
- Langlais J & Roberts KD. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 12:183-224.
- Leibo SP & Songsasen N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species. *Theriogenology* 57:303-26.
- Lin Y & Kan FWK. 1996. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod* 55:1133-1146.
- Loi P; Ptak G; Borboni B; Fulka J; Cappai P; Clinton M. 2001. Genetic Rescue of an Endangered Mammal by Cross-Species Nuclear Transfer Using Post-Mortem Somatic Cells. *Nature Biotechnology* 19(10):962-964.

- Lopes MD. 2002. Biologia reprodutiva de felinos domésticos (*Felis catus*) e técnicas artificiais de reprodução. In: Anais II Simpósio Paranaense de Atualização em Reprodução Animal e I Fórum ASBIA de Inseminação Artificial. Londrina PR CBRA.
- Luvoni GC; Kalchschmidt E; Leoni S; Ruggiero C. 2003. Conservation of feline semen part I: Cooling and freezing protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 5(4):203-208.
- Morais RN; Mucciolo RG; Gomes MLF; Lacerda O; Moraes W; Moreira N; *et al.* 2002. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 57(8):2027-2041.
- Munson L; Brown JL; Bush M; Packer C; Janssen D; Reiziss SM; Wildt DE. 1996. Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera Leo*) of serengeti plains and ngorongoro crater. *Journal of Reproduction and Fertility* 108:11-15.
- Nascimento EF & Santos RL. 2003. *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos* (2Ed), Belo Horizonte, Brasil.
- Oettlé EE. 1993. Sperm Morphology and Fertility in the Dog. *Journal of Reproduction and Fertility* 47: 257-260 (Suppl.).
- Oliveira TG & Cassaro K. 2005. *Guia de campo dos felinos do Brasil*. Instituto Pro-carnivoros, sociedade de Zoologicos do Brasil & Pró-vida Brasil, Fundação Parque Zoológico de São Paulo. 80p.
- Peña-Martínez AI; Luz LL; Barrio M; Herradón PG; Quintqila LA. 2003. Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 59:1725-1739.
- Pineda MH; Dooley MP; Martin PA. 1984. Long-Term Study on the Effects Of Electroejaculation on Seminal Characteristics of the Domestic Cat. *American Journal of Veterinary Research* 45(5):1038-41.

- Pope CE. 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 53:163-74.
- Pukazhenthil BS; Pelican K; Wildt DE; Howard JG. 1999. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biology of Reproduction*. 61:135-41.
- Rath D; Töpfer-petersen E; Michelmann HW; Schwartz P; Ebeling S. 2005. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of *in vivo* and *in vitro* produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* 63:352-362.
- SAEG-Sistema para Análises Estatísticas Versão 9.1. 2007. Fundação Arthur Bernardes, UFV-Viçosa.
- Santos MCR. 2009. Avaliação de métodos alternativos para análises da capacidade de ligação do espermatozóide caprino e estudo do polimorfismo no gene Izumo em caprino, devido à ação do congelamento do sêmen. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa MG.
- Sinowatz F; Wessa E; Neumüller C; Palma G. 2003. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reproduction of Domestic Animals* 38:141-146.
- Smith KD; Rodriguez-Rigau LJ; Steinberger E. 1977. Relation between índices of sêmen analysis and pregnancy rate in infertile couples. *Fertility and Sterility* 28(12):1314-1319.
- Swanson WF; Wildt DE; Cambre RC; Citino SB; Quigley KB; Brousset D; MORAIS RN; Moreira N; O'brien SJ; Johnson WE. 1995. Reproductive survey of endemic felid species in Latin American zoos: male reproductivestatus and implications for conservation. In: Joint Conference American Association of Zoo Veterinarians Houston. 10:374-380.
- Tebet MJ. 2004. Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato doméstico (*Felis catus*). Tese de Doutorado,

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho” SP 145p.

- Thomassen R; Sanson G; Krogenaes A; Fougner JA; Andersen Berg K; *et al.* 2006. Artificial Insemination with Frozen Semen in Dogs: a Retrospective Study of 10 Years Using a Non-Surgical Approach. *Theriogenology* 66(6-7):1645-1650.
- Waberski D; Magnus F; Mendonça Ferreira F; Petrunkina AM; Weitze E; Töpfer-Petersen E. 2005. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology* 63:470-484.
- Watson PF. 2000. The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Animal Reproduction Science* 60-61:481-492.
- Wildt DE; Brown JL; Bush M; Barone MA; Cooper KA; Grisham J; Howard JG. 1993. Reproductive status of cheetahs (*Acinonyx Jubatus*) in North American Zoos: the benefits of physiological surveys for strategic planning. *Zoo Biology*, 12(1):45-80.
- Wildt DE; Bush M; Howard JG; O'brien SJ; Meltzer D; Van Dyk A; *et al.* 1983. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biology Reproduction* 29:1019-1025.
- Wildt DE; Bush M; Goodrowe KL; Packer C; Pusey AE; Brown JL; *et al.* 1987. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature* 329(6137):328-331.
- Wildt DE; Donoghue AM; Johnston LA; Schmidt PM; Howard JG. 1992. Species and Genetic Effects on the Utility of Biotechnology for Conservation. *Symposia of the Zoological Society of London* 64:45-61.
- Wildt DE & Roth TL. 1997. Assisted Reproduction for Managing and Conserving Threatened Felids. *International Zoo Yearbook* 35(1):164-172.

ANEXOS

1. ANEXO I: Composição dos meios utilizados

TCM-199 - Modificado (COSTA, 1997)

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

TALP-HEPES - BAVISTER *et al.*, (1983), modificado por COSTA, 1995

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

2. ANEXO II: Diluições dos Fluoróforos para Preparo das Soluções Estoque e de Trabalho das Sondas Fluorescentes

Fonte: CELEGHINI, 2005

Iodeto de Propídio

Solução estoque

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

Solução Trabalho (0,5 mg/mL)

20 µL da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 980 µL de DPBS

Solução Trabalho (2 mg/mL)

80 µL da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 920 µL de DPBS

Armazenar em freezer, no escuro.

Hoescht 33342

Solução estoque

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

Solução trabalho

1,6 µL da solução estoque (25 mg/mL) + 998,4 µL de DPBS (40 µg/mL)

Armazenar a – 20°C no escuro

FITC-PSA

Solução trabalho (100 µg/mL)

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

Aliquotar e armazenar a 4 °C, no escuro.