

PAULO MENEZES HOLANDA BARROS

Estresse oxidativo e integridade do DNA em
sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno
(*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe

São Paulo
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1914
FMVZ

Barros, Paulo Menezes Holanda

Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775) / Paulo Menezes Holanda Barros. – São Paulo: P. M. H. Barros, 2007.

120 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe.

1. Animais silvestres. 2. Sêmen animal. 3. Estresse. 4. DNA.
5. Antioxidante. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

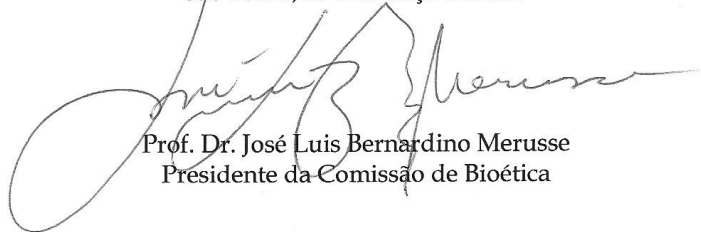
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estresse oxidativo e integridade de DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)", Protocolo nº445/2004, utilizando 12 (doze) gatos-do-mato, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Valquiria Hyppolito Barnabe, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Oxidative stress and DNA integrity on cold semen of little-spotted cat (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775" protocol number 445/2004, utilizing 12 (twelve) cats, under the responsibility of Prof^a Dr^a Valquiria Hyppolito Barnabe, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 29 de março de 2006



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética



Ministério do Meio Ambiente
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros / Coordenação Geral de Fauna
Centro Nacional de Pesquisa para a Conservação de Predadores Naturais
CENAP

LICENÇA PARA CAPTURA, COLETA, TRANSPORTE, EXPOSIÇÃO E FILMAGEM

Número da licença: 048/04	Número de registro no IBAMA:	Período de validade: 12 meses	Número do Processo no IBAMA: 02027.001772/2004-28
------------------------------	------------------------------	----------------------------------	--

Objetivo:

- Captura/coleta de animais silvestres/material zoológico
 Transporte de animais silvestres/material zoológico
 Coleta e transporte de material botânico (pesquisa científica)
 Transporte de produtos/subprodutos da fauna
 Exposição e/ou concurso de animais silvestres
 Outros (especificar):

Favorecido:

- Zoológico
 Instituição científica
 Pesquisador
 Expositor/concursionista
 Criadouro comercial
 Criadouro conservacionista
 Outros (especificar):

Nome do favorecido: Paulo Menezes Holanda Barros	Endereço: Rua Abílio Soares, 625 apto 104A São Paulo/SP
--	---

Transportador: Paulo Menezes Holanda Barros CRMV/SP – 12.821	Meio de transporte: Rodoviário
Procedência/local de captura/local de pesquisa: Zoológicos e/ou criadouros legalizados junto ao IBAMA	Responsável pela expedição (no caso de coleta/captura): --

Espécie(s):	Nome científico:	Nome comum:	Observação
-	<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato-pequeno	Transporte de amostras de sêmen coletadas de animais em cativeiro em zoológicos e/ou criadouros legalizados junto ao IBAMA

OBS: 1- OS RESPONSÁVEIS PELA EXPEDIÇÃO DEVERÃO APRESENTAR RELATÓRIO FINAL AO TÉRMINO DA VALIDADE DESTA LICENÇA, E ENCAMINHAR CÓPIA DAS PUBLICAÇÕES RESULTANTES DOS TRABALHOS OBJETOS DA PRESENTE LICENÇA. 2- ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA O USO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA ACESSAR INFORMAÇÃO DE ORIGEM GENÉTICA, CONTIDA NO TODO OU PARTE DO ESPÉCIME VEGETAL, FÚNGICO, MICROBIANO OU ANIMAL; EM SUBSTÂNCIAS PROVINDENTES DO METABOLISMO DESSES SERES VIVOS E DE EXTRATOS OBTIDOS DESSES ORGANISMOS VIVOS OU MORTOS, ENCONTRADOS EM CONDIÇÕES IN SITU, INCLUSIVE DOMESTICADOS OU MANTIDOS EM COLEÇÕES EX SITU, DESDE QUE COLETADOS EM CONDIÇÕES IN SITU, NO TERRITÓRIO NACIONAL, NA PLATAFORMA CONTINENTAL OU NA ZONA ECONÔMICA EXCLUSIVA, VISANDO ATIVIDADE EXPLORATÓRIA PARA IDENTIFICAR COMPONENTES DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E INFORMAÇÃO SOBRE O CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO, COM POTENCIAL DE USO COMERCIAL.

Local e data de emissão: Atibaia/SP, 31 de agosto de 2004.	Carimbo e assinatura da autoridade expedidora: Rose Lillian Gasparini Morato Substituta/Chefe de Centro Especializado CENAP/IBAMA
--	--

-VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO NACIONAL;
-SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR); INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS;
-VÁLIDAS SOMENTE SEM EMENTAS OU RASURAS;

ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:

-CAPTURA/COLETA E TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO CONSTANTE DE PROJETO ESPECÍFICO APROVADO;
-CAPTURA/COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITO AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO CONAMA DE Nº237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO;
-CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 595.596.597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL;
-CAPTURA/COLETA E TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BARROS, Paulo Menezes Holanda

Título: Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

Dedico,

Ao meu amor, Milena, uma "menina de ouro". Apesar de nenhuma dedicatória ou agradecimento ser capaz de expressar o quanto este trabalho também é seu.

Aos meus pais, Paulo e Lígia, pelos sacrifícios, abdições e exemplos para que hoje eu pudesse ser quem sou e estar onde estou.

Às minhas irmãs queridas Patrícia e Ana.

À minha turma Coxô, Gama, Tatiana, Gullo, Rodrigo, Tatinha, Thiago, Cabeça e Cabecinha, Didi, Muzamba, Pacheco, Fê, Belo, Paulão, Lú, Oscar, Beta, Lutti, Sander. Dedico à vocês esta e todas as minhas maiores conquistas.

Ao Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe. Não fosse o senhor, talvez os animais selvagens não seriam estudados neste departamento da maneira que são hoje.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, o maior responsável por toda minha formação em animais selvagens e, principalmente, pela minha admiração por eles.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão,

Ao amigo Marcílio Nichi, por sua amizade e ensinamentos. Sua alma extraordinária sempre pronta a ajudar, não importando quem, faz de você uma dessas pessoas raras cuja única dificuldade na vida é dizer não. Quero agradecer por tudo que fez por mim, por tudo que me ajudou a realizar. Obrigado por que você fez e fará parte da minha história.

À Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabé, pelas oportunidades e confiança.

Às amigas Sandra e Mara, pela amizade constante e, principalmente, por se responsabilizarem pelas colheitas no zôo.

Aos amigos que fiz no VRA, pela amizade, pela ajuda, por todos os momentos felizes e tristes. Muitas coisas aprendi com eles, muitos valores guardei e muitas vitórias conquistei. Não citarei seus nomes com medo de cometer a injustiça de esquecer alguém.

Ao amigo Rogério L. Zacariotti, pelas risadas, pela ajuda e pelas belas fotografias.

À amiga Carmen pelo carinho, ajuda, ensinamentos e orientações.

Aos funcionários do VRA, Harumi, Thaís, Alice, Ira, Belau, Luís, Miguel e Maria Amélia, especialmente à minha querida D. Silvia.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, Marcelo, Pietro, Visintin, Mayra e Camila.

À amiga Thaís Guimarães pela ajuda nas colheitas e no laboratório.

Às estagiárias Mariana e Patrícia, hoje colegas de pós-graduação, pela ajuda no experimento.

À amiga Karina Cavalcanti, pela amizade e carinho em todas as horas.

Ao amigo Snarf, uma pessoa simplesmente brilhante que me ajudou e me ensinou muito nessa jornada.

À Escola Paulista de Medicina, especificamente às meninas do Laboratório de Reprodução Humana Thiesa, Roberta, Adriana, Bárbara e Camile.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo, por ceder seu espaço e acesso aos animais deste experimento.

À Capes, pela bolsa contemplada no início do curso.

À Divisão de Certificação do Instituto de Tecnologia do Paraná pela convivência, amizade e incentivo para que este trabalho fosse realizado.

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)**. [Oxidative Stress and DNA integrity in chilled sêmen of tigrina (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)]. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A sobrevivência da maioria das espécies de *Felidae*s selvagens conhecidas, foi colocada em risco por diversos fatores, entre eles a perda difusa de habitat, a caça ilegal e a fragmentação e degradação de suas áreas de ocorrência. Para o sucesso de um plano conservacionista faz-se necessária a utilização de biotecnologias direcionadas à preservação da variabilidade genética das populações de animais selvagens. Na prática, a aplicação de técnicas reprodutivas no manejo destas populações enfrenta dificuldades como a distância entre os indivíduos que se deseja acasalar ou a distância destes em relação aos centros de pesquisa onde se encontra a estrutura necessária para manipulação de seus gametas. O resfriamento é uma técnica de conservação de sêmen frequentemente utilizada para contornar estes problemas, porém pode submeter os gametas ao estresse oxidativo. Sabe-se que as espécies reativas ao oxigênio responsáveis por este estresse podem causar danos estruturais significantes às membranas e, principalmente, ao material genético dos espermatozoides. O uso de diluidores e antioxidantes que possam promover uma proteção aos espermatozoides contra os danos do estresse oxidativo pode ser uma alternativa para manter a qualidade do sêmen sob refrigeração. Para avaliar esta hipótese, o sêmen do gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775) foi submetido a testes convencionais e funcionais em diferentes tempos de refrigeração a 4°C (2, 12 e 24 horas), utilizando-se três diluidores (TCM 199, Ham F10 e tris-gema-citrato) e o tratamento com glutatona reduzida (GSH) em diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) para obter uma melhora na qualidade do sêmen. Os testes convencionais utilizados foram a motilidade e vigor. Os funcionais compreenderam as avaliações da integridade das membranas plasmática e acrossomal, da atividade mitocondrial, e da fragmentação do material genético. Também foi avaliada a suscetibilidade das células espermáticas à peroxidação lipídica induzida através da mensuração da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados obtidos para as provas convencionais e funcionais, com exceção da resistência dos espermatozoides ao estresse oxidativo por meio da dosagem TBARS, indicaram que o diluidor tris-gema-citrato (TGC) foi superior aos diluidores TCM 199 (TCM) e Ham F10 (HAM), sendo que não houve efeito do tratamento com GSH. Para todos os diluidores as variáveis referentes aos testes funcionais apresentaram correlação com as variáveis referentes aos testes convencionais. Apenas para os diluidores HAM e TGC a concentração de TBARS apresentou correlação com a atividade mitocondrial e integridade acrossomal. Nas amostras diluídas no TGC não foram verificados efeitos do tratamento com GSH, ou do tempo de refrigeração no

grau de integridade do DNA das células espermáticas. Também nas amostras diluídas em TGC, a integridade do DNA correlacionou-se com a concentração de TBARS e com a atividade mitocondrial, mas não com os testes convencionais e os outros testes funcionais. Conclui-se que o melhor diluidor para manter o sêmen do gato-do-mato-pequeno sob refrigeração a 4°C, por 24 horas, é o diluidor à base de gema de ovo (TGC), sendo que o tratamento antioxidante com GSH nas concentrações utilizadas não apresentou efeito sobre a qualidade deste sêmen.

Palavras-chave: Animais silvestres. Sêmen animal. Estresse. DNA. Antioxidante.

BARROS, P. M. H. **Oxidative Stress and DNA integrity in chilled sêmen of tigrina (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)**. [Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)]. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The survival of most of the known wild feline species was jeopardized by diffuse habitat lost, illegal hunting and fragmentation and devastation of their occurrence areas. The use of biotechnologies aiming to preserve the genetic variability of wild animal populations is crucial for the success of a conservationist program. The practical application of reproductive biotechnologies on the management of these populations faces difficulties such as the distance between individuals included in a breeding plan or between the animals and the research centers where the necessary structure to manipulate their gametes is located. Semen cooling is a conservation technique frequently used to overcome those problems. However such technology may submit the spermatozoa to the oxidative stress. It is well known that the reactive oxygen species which are responsible for this stress can cause structural damages to the membranes and especially to the genetic material of the spermatozoa. The use of extenders and antioxidants that could protect the spermatozoa against oxidative damages can be an alternative to maintain the quality of semen samples under cooling. In order to test this hypothesis semen samples of tigrina (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775) was submitted to conventional and functional tests at different cooling periods (4°C; 2, 12 and 24 hours), using three extenders (TCM 199, Ham's F10 and Tris-egg yolk-citrate) and treatment with reduced glutathione (GSH) in different concentrations (0, 0.5, 1.0 and 1.5mM). Conventional tests used in the present experiment were motility and vigor. Functional tests included the evaluation of plasmatic and acrosomal membrane integrity, of mitochondrial activity and of DNA fragmentation. The susceptibility of the spermatozoa to the induced lipidic peroxidation followed by the measurement of thiobarbituric acid reactive substances concentration (TBARS) was used as an index of oxidative stress. Results obtained for the conventional and functional tests indicated that the tris-egg yolk citrate (TGC) extender was superior to the TCM 199 (TCM) and the Ham's F10 (HAM). No effect of GSH was observed. For all extenders, correlations were found between the functional tests and the conventional tests variables. Only for the HAM and TGC extenders, the concentration of TBARS showed negative correlation with mitochondrial activity and acrosomal integrity. For the samples diluted in TGC, no effects of GSH treatment or cooling time was observed on the spermatic cells DNA integrity. Also in sample diluted in TGC, the DNA integrity was correlated with the concentration of TBARS and the mitochondrial activity, but not with conventional tests the others functional tests. Results of the present experiment suggested that the best extender to maintain the semen of tigrina under 4°C

for 24 hours is the one containing egg yolk (TGC), and the antioxidant treatment with GSH showed no effect on semen quality.

Key-words: Wild animals. Animal semen. Stress. DNA. Antioxidant.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores das probabilidades para os efeitos principais dos diluidores TCM, HAM e TGC (DILUIDOR), dos tempos de refrigeração 2, 12 e 24 horas (TEMPO) e do tratamento antioxidante com glutatona reduzida nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5mM (GSH) e suas interações sobre as variáveis MOTILIDADE, VIGOR, Índice de Motilidade Espermática (IME), porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (E/N), porcentagem de células com acrossomo íntegro (POPE), concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e espermatozoides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 66
- Tabela 2 - Efeito dos diluidores TCM, HAM e TGC (média ± erro padrão, [IC95%]) sobre a MOTILIDADE, o VIGOR e Índice de Motilidade Espermática (IME) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4 °C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 67
- Tabela 3 - Efeito dos tratamentos antioxidantes (média ± erro padrão, [IC95%]) com diferentes concentrações de glutatona reduzida adicionadas aos diluidores (GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre a MOTILIDADE (%), o VIGOR (0-5) e Índice de Motilidade Espermática (IME) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 68
- Tabela 4 - Efeito do tempo (média ± erro padrão, [IC95%]; para 2, 12 e 24 HORAS) sobre a MOTILIDADE (%), o VIGOR (0-5) e Índice de Motilidade Espermática (IME) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 69
- Tabela 5 - Efeito dos diluidores TCM, HAM e TGC (média ± erro padrão, [IC95%]) sobre a porcentagem de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra (E/N) em amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 70
- Tabela 6 - Efeito dos tratamentos antioxidantes (média ± erro padrão, [IC95%]) com diferentes concentrações de glutatona reduzida adicionadas aos diluidores (GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre a porcentagem de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra (E/N) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 71

- Tabela 7 - Efeito do tempo (média \pm erro padrão, [IC95%]); para 2, 12 e 24 HORAS) sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana plasmática íntegra (E/N) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 72
- Tabela 8 - Efeito da combinação dos tratamentos Diluidor (TCM, HAM, TGC), Tempo (2, 12 e 24 horas) e GSH (concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5mM de glutathiona reduzida no diluidor) sobre a porcentagem (média \pm erro padrão) espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 73
- Tabela 9 - Efeito da combinação dos tratamentos Diluidor (TCM, HAM, TGC), Tempo (2, 12 e 24 horas), e GSH (concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5mM de glutathiona reduzida no diluidor) sobre porcentagem (média \pm erro padrão) de espermatozóides classe I para o teste de avaliação da atividade mitocondrial (DAB I) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), refrigeradas a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 76
- Tabela 10 - Efeito dos diluidores TCM, HAM e TGC sobre a porcentagem (média \pm erro padrão, [IC95%]) de espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 78
- Tabela 11 - Efeito dos tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutathiona reduzida adicionadas aos diluidores (GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre a porcentagem (média \pm erro padrão, [IC95%]) de espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 79
- Tabela 12 - Efeito do tempo (2, 12 e 24 HORAS) sobre a porcentagem (média \pm erro padrão, [IC95%]) de espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 79
- Tabela 13 - Efeito dos diluidores TCM, HAM e TGC sobre as concentrações (média \pm erro padrão, [IC95%]) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 81

- Tabela 14 - Efeito dos tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutathiona reduzida adicionadas aos diluidores (GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre as concentrações (média \pm erro padrão, [IC95%]) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 82
- Tabela 15 - Efeito do tempo (2, 12 e 24 HORAS) sobre as concentrações (média \pm erro padrão, [IC95%]) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 82
- Tabela 16 - Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), células classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), células com membrana plasmática íntegra (E/N), células com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT), Vigor (VIG), Índice de Motilidade Espermática (IME), de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), coletadas através de eletroejaculação e mantidas sob refrigeração a 4°C, por 2, 12 e 24 horas, no diluidor TCM com diferentes concentrações de GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 84
- Tabela 17 - Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT), Vigor (VIG), Índice de Motilidade Espermática (IME), de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) mantidos em cativeiro, coletadas através de eletroejaculação e armazenadas sob refrigeração a 4°C, por 2, 12 e 24 horas, no diluidor HAM com diferentes concentrações de GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 86
- Tabela 18 - Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT), Vigor (VIG), Índice de Motilidade Espermática (IME), de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) mantidos em cativeiro, coletadas através de eletroejaculação e armazenadas sob refrigeração a 4°C, por 2, 12 e 24 horas, no diluidor TGC com diferentes concentrações de GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 88

- Tabela 19 - Valores das probabilidades para os efeitos principais dos tempos de refrigeração 2, 12 e 24 horas (TEMPO) e do tratamento antioxidante com glutatona reduzida nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5mM (GSH), e suas interações sobre as variáveis: Motilidade; Vigor; Índice de Motilidade Espermática (IME); espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE); concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV); e espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C no diluidor TGC e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 90
- Tabela 20 - Efeito dos tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutatona reduzida adicionadas aos diluidores (média ± erro padrão, [IC95%]; para GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre a Motilidade; Vigor; Índice de Motilidade Espermática (IME); espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE); concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C no diluidor TGC e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 91
- Tabela 21 - Efeito dos tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutatona reduzida adicionadas aos diluidores (média ± erro padrão, [IC95%]; para GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre a porcentagem (média ± erro padrão) de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C no diluidor TGC e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 92
- Tabela 22 - Efeito do tempo (média ± erro padrão, [IC95%]; para 2, 12 e 24 HORAS) sobre a Motilidade; Vigor; Índice de Motilidade Espermática (IME); espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE); concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C no diluidor TGC e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 94
- Tabela 23 - Efeito do tempo (2, 12 e 24 HORAS) sobre a porcentagem (média ± erro padrão, [IC95%]) de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C no diluidor TGC e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 96

Tabela 24 - Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espermatozoides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), porcentagem de espermatozoides classes I, II, III e IV na avaliação de integridade do DNA (COMETAI, II, III e IV), espermatozoides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozoides com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT), Vigor (VIG), Índice de Motilidade Espermática (IME), de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) mantidos em cativeiro, coletadas através de eletroejaculação e armazenadas sob refrigeração a 4°C, por 2, 12 e 24 horas, no diluidor TCM com diferentes concentrações de GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007..... 97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 HIPÓTESE	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 REVISÃO DE LITERATURA	28
4.1 Felinos neotropicais.....	28
4.2 Características reprodutivas da espécie.....	30
4.3 Aspectos gerais da conservação do sêmen de Felídeos.....	31
4.3.1 Criopreservação	32
4.3.2 Refrigeração	33
4.4 Colheita de sêmen em Felídeos.....	35
4.5 Avaliação de sêmen em Felídeos	35
4.6 Testes Funcionais.....	36
4.6.1 Integridade de membrana plasmática	36
4.6.2 Integridade acrossomal	37
4.6.3 Atividade citoquímica mitocondrial	38
4.6.4 Integridade de DNA	39
4.7 Estresse oxidativo	40
4.7.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e o espermatozóide	41
4.7.2 Mecanismos de proteção antioxidantes seminais	43
4.7.3 Tratamento antioxidante	44
4.7.4 A Glutathiona	45
4.7.5 Mensuração do estresse oxidativo	46
5 MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1 Delineamento experimental.....	49
5.2 Animais	50
5.3 Contenção e anestesia	52
5.4 Colheita do sêmen	52
5.5 Processamento do sêmen.....	53
5.6 Testes Convencionais	55
5.6.1 Avaliação da Motilidade Espermática	55
5.6.2 Avaliação do Vigor Espermático	55
5.6.3 Índice de Motilidade Espermática	55
5.7 Testes Funcionais.....	56

5.7.1 Avaliação da Integridade Acrossomal	56
5.7.2 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática	57
5.7.3 Avaliação da Atividade Mitocondrial	57
5.7.4 Avaliação da integridade do DNA espermático	59
5.8 Avaliação do Índice de Resistência ao Estresse Oxidativo	60
5.9 Análise estatística	61
5.9.1 Análise estatística do Experimento 1	62
5.9.2 Análise estatística do Experimento 2	63
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
6.1 Considerações iniciais	65
6.2 Experimento 1	66
6.2.1 Testes Convencionais	67
6.2.2 Testes Funcionais	70
6.2.3 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico	80
6.2.4 Correlações	83
6.2.4.1 <i>Diluidor TCM</i>	83
6.2.4.2 <i>Diluidor HAM</i>	85
6.2.4.3 <i>Diluidor TGC</i>	87
6.3 Experimento 2	89
6.3.1 Efeito do tratamento antioxidante	90
6.3.2 Efeito do tempo	93
6.3.3 Correlações	96
6.4 Considerações Finais	98
6.5 Resumo dos resultados	100
7 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	105

*"...Todas as coisas estão ligadas,
como o sangue que une uma família,
tudo o que acontece com a Terra,
acontece com os filhos e filhas da Terra...
...o homem não tece a teia da vida,
ele é apenas um fio.
Tudo o que faz à teia, ele faz a si mesmo".*

- Ted Perry, inspirado no "Chief Seattle", 1971

INTRODUÇÃO

"A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada".

- Albert Einstein

1 INTRODUÇÃO

Assim como para a maioria das espécies selvagens conhecidas pelo Homem, a sobrevivência dos *Felídeos* selvagens foi colocada em risco pela perda difusa de habitat, pela caça ilegal e até mesmo para povoar cativeiros particulares. Ainda hoje, além da fragmentação e degradação de suas áreas de ocorrência, esses *Felídeos* continuam sendo caçados.

Os *Felídeos* selvagens endêmicos da América Latina participam de todas as listas¹, sejam negras ou vermelhas, que classificam as espécies de acordo com seu risco de extinção. No Brasil, este cenário é um reflexo da dificuldade ao acesso à informação pela maioria da população que ignora o conceito de Sustentabilidade. Sob a ótica de um pensamento sistêmico, a falta de alfabetização ecológica faz com que, em cadeia, o problema se reflita em diversas áreas de uma sociedade (CAPRA, 1996; MATURANA; VARELA, 2001).

As relações entre comunidades e ecossistemas nos quais os *Felídeos* silvestres estão inseridos são emaranhadas e pouco estudadas, representando um forte argumento em prol da Conservação (OLIVEIRA, 1994). Tais relações indicam os *Felídeos* como uma espécie-chave, cuja remoção pode alterar o balanço de comunidades inteiras, animais ou vegetais. Planos de conservação direcionados para uma única espécie são de especial interesse no caso de *Felídeos*, pois oferecem proteção para todo um ecossistema devido aos requisitos ecológicos e territoriais desses animais (OLIVEIRA, 1994).

Em meados dos anos 90 houve a consolidação de uma idéia que vinha sendo cultivada desde o final dos anos 70, de que para o sucesso de um plano conservacionista se faz necessária a utilização de biotecnologias direcionadas à preservação da variabilidade genética das populações de animais selvagens e, para isso, são necessários programas cooperativos de reprodução e manejo para a manutenção de populações auto-sustentáveis (WILDT et al., 1995).

Diante deste cenário, as pesquisas em reprodução no Brasil, México e Estados Unidos vêm sendo o foco principal na conservação desses *Felídeos* nos últimos dez anos (SWANSON; BROWN, 2004).

Por outro lado, na prática, a aplicação de biotécnicas reprodutivas no manejo de populações de animais silvestres, enfrenta, além de dificuldades técnicas, transtornos logísticos, como a distância entre os indivíduos que se deseja acasalar ou a distância destes em relação aos centros de pesquisa. A estrutura necessária para manipulação dos gametas desses indivíduos, muitas vezes, só é encontrada nesses centros, havendo

¹ Apêndix I (CITES, 2007); The 2006 IUCN Red List of Threatened Species (IUCN, 2006); Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 2003).

assim a necessidade de transportar o sêmen do local de colheita para o laboratório (QUEIROZ, 2003).

Visando colaborar com o avanço da biotecnologia da reprodução animal e através desta ferramenta contribuir para o crescimento de um ideal de Sustentabilidade cada vez mais técnico e menos filosófico, este trabalho aborda questões relevantes para a manutenção de populações geneticamente viáveis, no que tange a conservação dos gametas de uma espécie de felino neotropical ameaçada de extinção.

HIPÓTESE

"Se, a princípio, a idéia não é absurda, então não há esperança para ela".

- Albert Einstein

2 HIPÓTESE

A hipótese deste experimento é a de que o sêmen do gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775) pode ser mantido sob refrigeração, facilitando suas aplicações na conservação e manutenção de populações geneticamente viáveis através de técnicas reprodutivas, e que o tratamento antioxidante com glutathione reduzida melhora a qualidade deste sêmen.

OBJETIVOS

*"No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade".
- Albert Einstein*

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente experimento são divididos em objetivo geral e objetivos específicos.

3.1 Objetivo geral

Avaliar a célula espermática do gato-do-mato-pequeno sob refrigeração, quanto à resistência ao estresse oxidativo e integridade do seu material genético.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia de diferentes diluidores durante a refrigeração do sêmen de gato-do-mato-pequeno através de testes convencionais e funcionais, da resistência dos espermatozoides ao estresse oxidativo por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, em diferentes tempos de refrigeração e com adição de diferentes concentrações de glutathione reduzida aos diluidores.
- Correlacionar as variáveis resposta entre si nos diferentes diluidores.
- Mensurar o grau de integridade do material genético das células espermáticas no diluidor que apresentar os melhores resultados e verificar o efeito do tratamento com glutathione reduzida e do tempo de resfriamento.
- Correlacionar os resultados obtidos para o grau de integridade do material genético com as variáveis resposta avaliadas.

REVISÃO DE LITERATURA

"Duas coisas são infinitas: o universo e a estupidez humana".

- Albert Einstein

4 REVISÃO DE LITERATURA

O gato-do-mato-pequeno é um felino neotropical ameaçado de extinção, sendo o estudo de suas características reprodutivas de extrema importância para sua conservação e das outras espécies que compõem sua rede.

4.1 Felinos neotropicais

A *Família Felidae* está classificada dentro da *Ordem Carnívora*, que por sua vez pertence à *Classe Mammalia* (NOWAK; PARADISO, 1991). É constituída de 37 espécies que divergiram de um recente ancestral comum há cerca de 10 a 15 milhões de anos (JOHNSON; O'BRIEN, 1997) e se espalharam por todos os continentes, exceto a Antártica e Austrália (WILSON; REEDER, 1992). São atualmente reconhecidos oito grupos que refletem as radiações evolucionárias monofiléticas na história da *Família* (JOHNSON; O'BRIEN, 1997).

Na América Latina encontram-se dez espécies que representam três desses grupos: a jaguatirica (*Leopardus pardalis*); o gato maracajá (*Leopardus wiedii*); o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*); o gato-do-mato-grande (*Oncifelis geoffroyi*); o gato palheiro (*Oncifelis colocolo*); o gato chileno (*Oncifelis guigna*); o gato-dos-Andes (*Oreailurus jacobita*); o gato mourisco (*Herpailurus yaguaroundi*); a suçuarana (*Puma concolor*) e a onça pintada (*Panthera onca*) (OLIVEIRA, 1994; JOHNSON; O'BRIEN, 1997). Pelo fato de habitarem a Região Neotropical, são conhecidos como Felinos Neotropicais (EISENBERG; REDFORD, 1992).

O gato-do-mato-pequeno faz parte da linhagem da jaguatirica que é formada por um grupo de sete espécies felinas de pequeno e médio porte. Provavelmente, estas espécies se irradiaram de um ancestral comum durante a formação do Istmo do Panamá há cerca de cinco a seis milhões de anos (SLATTERY et al., 1994). Os integrantes deste grupo se distribuem em dois Gêneros: *Oncifelis* e *Leopardus* (O'BRIEN, 1996). Possuem uma característica especial em comum: 18 pares de cromossomos, ou seja, um par de cromossomos a menos que os demais felinos, consequência de uma fusão cromossômica (ROBINSON, 1974).

O gênero *Leopardus* constitui-se de três espécies de gatos pintados: a jaguatirica, o gato maracajá e o gato-do-mato-pequeno. Na natureza, estas três espécies possuem uma distribuição ampla dentro da América Latina, ocupando uma grande variedade de habitats no caso da jaguatirica, e, mostrando preferência por florestas no caso do gato

maracajá e do gato-do-mato-pequeno (OLIVEIRA, 1994). Este último, nosso objeto de estudo, ocorre da América Central, na Costa Rica, ao Paraguai e norte da Argentina e em quase todo o território brasileiro (Amazônia, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos). Sua ocorrência ao longo da Mata Atlântica ainda está insuficientemente documentada (MOREIRA, 2001).

A maior causa do declínio da população destes felinos na América Latina está vinculada à fragmentação ou perda de habitat em decorrência das atividades humanas, como a expansão agropecuária, a construção de hidroelétricas, o crescimento demográfico, a caça em resposta à ação predatória dos felinos sobre animais domésticos e também pelo manejo inadequado em cativeiro (OLIVEIRA, 1994; WILDT, 1996). Comunidades intactas de felinos são raras em florestas neotropicais. Mesmo onde não foram caçados, em geral, outras espécies que lhe servem de alimento já desapareceram (CRAWSHAW, 1997).

Ao longo do tempo, as espécies sujeitas a esse tipo de pressão que conseguirem escapar da extinção deverão sofrer os efeitos da endogamia (WILDT et al., 1987). O endocruzamento pode ser um fator determinante para a extinção de espécies devido pelo fato deste fenômeno poder acarretar desde o aumento da susceptibilidade a doenças até numa queda da eficiência reprodutiva por diversos fatores associados à homozigose (WILDT et al., 1987; MILLER; WAITS, 2003; HAAS VAN DORSSER; STRICK, 2005; STOKSTAD, 2005; WHITEMAN et al., 2006).

A formação de populações cativas representa uma estratégia para auxiliar a manutenção da variabilidade genética das espécies (CONWAY, 1989). Jardins zoológicos e outras instituições que fazem reprodução “*ex situ*” compartilham a grande responsabilidade de ajudar a prevenir a rápida extinção das espécies selvagens, visto que algumas espécies que haviam sido extintas na natureza foram salvas através da reprodução em cativeiro; outras ainda esperam a melhoria das condições do que resta de seu hábitat natural (ISIS, 2001).

Porém, embora seja comum avistá-los em zoológicos brasileiros, sabe-se que os pequenos felinos não se reproduzem facilmente em cativeiro por motivos relacionados com as más condições de manejo nutricional e, principalmente, reprodutivo, cujas falhas são derivadas da falta de conhecimento da fisiologia reprodutiva básica (MELLEN, 1991; SWANSON et al., 1995; MOREIRA, 2001).

4.2 Características reprodutivas da espécie

Historicamente, os pequenos *Felídeos* sul-americanos têm sido caracterizados por seu baixo desempenho reprodutivo em cativeiro (MOREIRA, 2001).

Em 1995, Swanson et al. publicaram um levantamento sobre parâmetros reprodutivos em machos de oito espécies endêmicas de felinos mantidas em instituições latino-americanas. Para esses autores, em geral, os animais se reproduziam pouco e a maior parte dos ejaculados obtidos era azoospermico ou oligozoospermico. Embora os autores deste estudo reconhecessem que múltiplas variáveis pudessem estar envolvidas, sugeriram que a dieta inadequada e o estresse decorrente de condições precárias de manutenção pudessem ser os fatores mais limitantes. Para Moreira (2001), “de uma maneira geral, as particularidades que envolvem os êxitos e fracassos na reprodução em cativeiro são pouco compreendidas”.

Os poucos dados publicados sobre as características reprodutivas do gato-do-mato-pequeno são geralmente baseadas nas observações em cativeiro e, de certa forma, subjetivas. A puberdade, por exemplo, está correlacionada com a idade e o peso corporal para as fêmeas, já para os machos, é variavelmente descrita como sendo o momento da primeira espermatogênese ou coincidente com a capacidade de ejacular (JOHNSTON et al., 2001).

Moreira et al. (2001), sugerem que a espécie parece ser ovuladora-induzida, com a ovulação ocorrendo apenas após o estímulo copulatório. Desta maneira, o pênis dos felinos do Gênero *Leopardus*, com exceção do gato maracajá, é semelhante ao do gato doméstico apresentando espículas penianas (SWANSON et al., 1995; MORAIS, 1999). Essas espículas são estruturas córneas andrógeno-dependentes, responsáveis pelo estímulo neuro-endócrino necessário para que ocorra a ovulação durante a cópula (JOHNSTON; ROOT; OLSON, 2001).

Através do estudo de hormônios esteróides reprodutivos e atividade ovariana em fêmeas de gato-do-mato-pequeno em cativeiro, foi possível observar que essas espécies não apresentam um padrão característico de sazonalidade reprodutiva e que são poliétricas (MOREIRA et al., 2001).

Sinais de cio, assim como o comportamento durante o acasalamento, são descritos como uniformes entre as espécies de *Felídeos* e similares àqueles do gato doméstico (EWER, 1973). Repertórios comportamentais associados ao cio incluem: o rolamento no solo; o ato de esfregar-se contra objetos; a vocalização; o andar de modo repetitivo com maior atividade dos membros torácicos e pélvicos; comportamento de auto-limpeza e micção com maior frequência; borrifamento de urina; e lordose (MICHAEL, 1961).

Segundo Moreira (2001),

[...] o estro na maioria dessas espécies tem sido identificado como "silencioso", ou as fêmeas mostram sinais sutis. O estro silencioso torna difícil a escolha do momento oportuno para introduções de pares cativos que, em casos de incompatibilidades comportamentais, podem resultar em injúrias por luta ou mesmo morte. Portanto, as introduções iniciais com fins reprodutivos devem ser cuidadosamente monitoradas, e, outro aspecto que deve ser considerado, caso ocorra a concepção, é a possibilidade da fêmea ou o macho matar o(s) filhote(s) em uma situação estressante.

A duração do estro para a espécie é de 3 a 9 dias (GREEN, 1991), sendo que o ciclo estral dura em torno de 16 dias (MOREIRA, 2001) e a gestação dura de 73 a 78 dias (GREEN, 1991). Em média, nascem de um a dois filhotes (LEYHAUSEN; FALKENA, 1966).

De um modo geral, uma melhor compreensão da fisiologia e das características reprodutivas dos felinos neotropicais é necessária para obter-se um desempenho reprodutivo mais consistente em cativeiro, aumentando assim o número de indivíduos que reproduzem na população, e para que biotécnicas de reprodução voltadas para a conservação sejam aplicadas com maior sucesso (SWANSON et al., 1995; MOREIRA et al., 2001).

4.3 Aspectos gerais da conservação do sêmen de Felídeos

Atualmente, existem dois métodos de conservação descritos para os Felídeos: a refrigeração – que utiliza temperaturas acima do ponto de fusão dos líquidos; e o congelamento – que utiliza temperaturas abaixo deste ponto (LUVONI et al., 2003).

A refrigeração consiste na manutenção do sêmen a 4 ou 5°C, adicionado a um diluente (HARRIS et al., 2001; 2002). Para Batellier et al. (2001), "o sucesso do uso do sêmen resfriado depende de uma série de fatores, sendo que a temperatura e a composição do diluidor são os mais relevantes".

Este método parece ser o mais indicado para utilização em biotécnicas reprodutivas, quando o transporte do sêmen pode ser realizado em questão de horas ou até poucos dias (LUVONI et al., 2003; Queiroz, 2003).

O congelamento, ou criopreservação, é o método no qual se mantém o sêmen congelado em nitrogênio líquido a -196°C por tempo indeterminado. Pode ser transportado a qualquer distância para utilização em biotécnicas reprodutivas e tem um grande potencial de conservação, o que faz deste método a forma de armazenamento de eleição para a constituição de Bancos de Recursos Genéticos (TEBET, 2004).

4.3.1 Criopreservação

Os protocolos de criopreservação conhecidos expõem as células espermáticas a inúmeras situações de estresse que comprometem sua viabilidade, entre elas: a exposição à temperaturas não fisiológicas; o estresse osmótico causado pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio diluidor; e a formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular (WATSON; MARTIN, 2000).

Para minimizar os efeitos estressantes da criopreservação, algumas substâncias crioprotetoras são adicionadas ao sêmen promovendo alterações das propriedades físicas da solução. Estes agentes crioprotetores podem atravessar ou não a membrana plasmática, dependendo do seu peso molecular (AMANN; PICKETT, 1987). Para os *Felídeos* selvagens, existem relatos do uso dos seguintes crioprotetores: glicerol; dimetil-sulfóxido (DMSO); e dodecil sulfato de sódio (SDS) (PUKAZHENTHI et al., 2002; TEBET, 2004).

No intuito de preservar a qualidade espermática, é de suma importância conhecer as características fisiológicas espécie-específicas do sêmen, como demonstrado pelos pobres resultados obtidos no passado, quando se tentava utilizar diluidores e procedimentos desenvolvidos para bovinos no sêmen de gatos (GOODROWE et al., 1989). Diante disso, já foram realizados diversos estudos envolvendo, especificamente, a conservação do sêmen de felinos selvagens (SWANSON et al., 1996a; ZAMBELLI et al., 2002; LUVONI et al., 2003; LUVONI, 2006; VILLAVARDE et al., 2006), assim como, já foram feitas descrições de protocolos de criopreservação de sêmen em gato doméstico (LENGWINAT; BLOTTNER, 1994; AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2002; ZAMBELLI et al., 2002; LUVONI et al., 2003) e em *Felídeos* selvagens (HOWARD, 1993; SWANSON et al., 1996b; PUKAZHENTHI et al., 2001). Entretanto, para o sêmen do gato-do-mato-pequeno, até então, existem poucos relatos de criopreservação, ainda assim em um pequeno número de indivíduos (MORAIS, 2001; SWANSON et al., 2003; TEBET, 2004).

De um modo geral, o protocolo mais utilizado para as espécies selvagens é o proposto pelo manual de treinamento do "Center for New Opportunities in Animal Health Sciences", National Zoological Park, EUA, sendo que tal protocolo foi desenvolvido na década de 90 por Howard (1993), e vem sendo frequentemente utilizado sem muitas modificações para criopreservar sêmen de felinos selvagens desde então (SWANSON et al., 1996a,b; PUKAZHENTHI et al., 2002). Porém, o mesmo autor do protocolo proposto por aquele manual, num estudo mais recente em colaboração com outros pesquisadores, reconhece que o método foi desenvolvido numa época anterior às descobertas de algumas propriedades específicas dos gametas e possui algumas inadequações (PUKAZHENTHI et al., 2002).

Independente do método de criopreservação utilizado, todos eles submetem as células espermáticas a condições anisomóticas que promovem variações intensas no volume celular, podendo ser potencialmente letais às mesmas (KAMPA, 2005). Quando o processo de resfriamento do sêmen pré-congelamento ocorre de forma muito rápida, a substituição da água intracelular pelo crioprotetor não ocorre em igual velocidade para manter o equilíbrio, assim a água que permanece dentro da célula transforma-se em cristais de gelo causando sua morte (HAMMERSTED; GRAHAM; NOLAN, 1990). Isto não ocorre quando o resfriamento é lento e as células perdem um volume de água suficiente para concentrar o soluto intracelular (HAMMERSTED; GRAHAM; NOLAN, 1990). Paradoxalmente, células resfriadas muito lentamente sofrem uma perda severa de água e são expostas por um longo período a uma solução com alta concentração de soluto, fatores que também causam lesão celular (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990).

Portanto, apesar dos diferentes mecanismos, ambas as velocidades de resfriamento podem causar dano celular, e um espermatozóide que sobrevive à temperaturas abaixo de zero ainda sofre os efeitos do descongelamento e da remoção do crioprotetor – tão danosos quanto o próprio congelamento (AGCA; CRITSER, 2002).

Diante deste cenário, estudos vêm sendo desenvolvidos em gatos domésticos e selvagens para se conhecer melhor o comportamento da célula espermática dos *Felídeos* frente às várias condições estressantes da criopreservação, objetivando a criação de protocolos mais apropriados e outras formas de conservação do sêmen para sua aplicação em biotécnicas reprodutivas, como o resfriamento (PUKAZHENTHI et al., 1999; LUVONI et al, 2003; VILLAVERDE et al., 2006).

4.3.2 Refrigeração

Queiroz (2003), concluiu em seus experimentos com jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) que “o sêmen conservado por refrigeração mantém qualidade satisfatória durante intervalos de tempos limitados, porém, se utilizado em médio prazo (até 48 horas), pode apresentar qualidade superior ao sêmen criopreservado”.

Durante o resfriamento do sêmen à temperaturas acima do ponto de fusão das soluções, alguns espermatozóides podem sofrer a perda da integridade de membranas e da função celular, fenômeno chamado de Choque do Resfriamento, ou Choque Frio (WATSON, 1995). Este fenômeno é particularmente observado em espermatozóides que são resfriados muito rapidamente ou muito lentamente, caracterizando-se pela perda rápida e permanente da motilidade (AGCA; CRITSER, 2002). Pukazhenthhi et al. (1999), estudaram a sensibilidade do espermatozóide felino sob várias taxas de resfriamento e

concluíram que “o resfriamento rápido é mais deletério que o resfriamento lento para a integridade morfológica, acrossomal e para a motilidade”. Alguns autores acreditam que esta sensibilidade varia de acordo com a espécie, e é atribuída às diferenças existentes na composição lipídica das membranas dos espermatozoides (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990; AGCA; CRITSER, 2002).

Além da resistência inerente à espécie, a proteção contra o Choque Frio oferecida pelo diluidor também vêm sendo discutida. Howard (1993), afirmou que “quando mantido à temperatura ambiente, sem qualquer processamento, o sêmen de Felídeos selvagens sustenta sua motilidade por poucas horas”. O mesmo autor, e outros pesquisadores, demonstraram que a adição do meio de cultivo celular convencional de Ham F10 ao sêmen pode prolongar significativamente a viabilidade espermática, porém, após algumas horas, a manutenção desta viabilidade ainda é insatisfatória, o que pode ser corrigido refrigerando-se a amostra, fato que poderia estar relacionado a algum tipo de proteção oferecida pelo meio de Ham F10 (OLIVA et al., 1991; HOWARD, 1993; SANTYMIRE et al., 2006, 2007).

Um diluidor normalmente utilizado para a criopreservação do sêmen de gatos domésticos foi descrito inicialmente por Platz e Seager (1978), sendo constituído por gema de ovo, lactose e glicerol. Pukazhenth et al. (1999), avaliaram a eficiência de uma variante daquele diluidor sem o glicerol (PDV - “*Platz Diluent Variant*”.) na refrigeração de sêmen de felinos. Este estudo levou seus autores à conclusão de que as células espermáticas felinas possuem clara afinidade por diluentes à base de gema de ovo, uma vez que, ao serem resfriadas na presença do PDV, mantiveram a proporção de espermatozoides móveis e motilidade progressiva em níveis superiores durante períodos mais longos do que o sêmen “*in natura*” ou suspenso em meios de cultivo celulares convencionais (dados apresentados graficamente, $p < 0,05$).

Este fato poderia ser explicado pelas afirmações de alguns autores de que a gema do ovo estabiliza a membrana plasmática protegendo-a contra o Choque Frio (WATSON, 1990; HOLT, 2000; LUVONI et al., 2003). Acredita-se que esta proteção seja fornecida pela sua ação coloidal no meio e por um componente da gema, provavelmente uma lipoproteína de baixa densidade (WATSON, 1979). Por outro lado, há autores que afirmam que a gema do ovo também tenha ações deletérias, agindo como indutora da capacitação espermática e alterando a estrutura da cromatina do sêmen (GIL et al., 2003).

De uma maneira geral a refrigeração parece ser uma excelente ferramenta para a conservação dos *Felídeos* (PUKAZHENTHI et al., 1999; LUVONI et al., 2003; QUEIROZ, 2003; VILLAVERDE et al., 2006).

4.4 Colheita de sêmen em Felídeos

Segundo Howard (1983), "vários estudos vêm demonstrando que as características do sêmen e a resposta para as várias técnicas de colheita é espécie-específica".

Desde a década de 70, diferentes métodos para obtenção do sêmen de *Felídeos* visando a reprodução assistida vêm sendo descritos, sendo eles: uso de vagina artificial (SOJKA; JENNINGS, 1970; SOJKA; JENNINGS; HAMNER, 1970; ZAMBELLI; BELLUZZI, 1998); eletroejaculação (SEAGER, 1976, 1978; DOOLEY; MURASE; PINEDA, 1983; JOHNSTONE, 1984; PINEDA; DOOLEY; MARTIN, 1984; HOWARD; BUSH; WILDT, 1986); aspiração testicular com agulha fina (LEME et al., 2000); e a obtenção diretamente do epidídimo ou vaso deferente de testículos isolados (HOWARD; BUSH; WILDT, 1986; LUVONI et al., 2003). Estes últimos podem ser fontes preciosas de espermatozóides em animais que vieram a óbito recentemente ou que serão orquiectomizados (GOODROWE; HAY, 1993; LUVONI et al., 2003; TSUITSUI et al., 2003).

A eletroejaculação é o método mais apropriado para obtenção de sêmen de *Felídeos* selvagens, podendo ser realizada em animais anestesiados, sendo o método mais adequado para se reduzir o estresse e o risco, tanto para o animal como para a equipe durante a colheita do sêmen (HOWARD, 1993). Esta técnica envolve o estímulo das vias nervosas dos órgãos reprodutivos por meios de eletrochoques de baixa voltagem e amperagem (SEAGER, 1976). A extensão dos membros posteriores com leve abdução dos membros anteriores são indicadores físicos para determinação do pico de voltagem e correto posicionamento do eletrodo (HOWARD 1993). Amostras de sêmen obtidas através de eletroejaculação tendem a ter maior volume, pH mais elevado e menor concentração espermática, uma vez que há uma grande estimulação simpática quando este método é utilizado (DOOLEY; PINEDA, 1986; DOOLEY et al., 1991; AXNÉR; LINDEFORSBERG, 2002). Em um estudo realizado por Pineda et al. (1984), foi demonstrado que a estimulação elétrica e anestésias repetidas não afetaram a capacidade de ejaculação dos gatos utilizados.

4.5 Avaliação de sêmen em Felídeos

As técnicas clássicas de avaliação seminal em *Felídeos* consistem de uma série de análises descritivas que visam determinar o volume de ejaculado, pH, proporção de espermatozóides móveis, motilidade progressiva, concentração espermática, morfologia estrutural, entre outras (HOWARD, 1993). Estas análises devem contemplar vários

atributos simultaneamente para garantir maior confiabilidade na determinação do potencial de fertilização (GRAHAM, 2001). Porém, há mais de uma década, autores vêm consistentemente afirmando que os métodos descritivos citados acima são insatisfatórios na avaliação da capacidade fecundante do sêmen (GOODROWE; HAY, 1993; HOWARD, 1993; AITKEN, 2006).

De acordo com Aitken (2006), a fertilidade de uma determinada amostra seminal é determinada pela sua competência funcional, o que não pode ser avaliado baseando-se nos testes morfológicos convencionais rotineiramente utilizados. Sendo assim, alguns testes voltados para a avaliação das diferentes funções da célula espermática foram desenvolvidos; estes são denominados Testes Funcionais (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003; RIJSSELAERE et al., 2005).

4.6 Testes Funcionais

Os testes funcionais podem ser divididos de acordo com as diferentes funções de cada componente da célula espermática, tais como avaliação da integridade de membrana plasmática, integridade do acrossomo, integridade do material genético e atividade mitocondrial da peça intermediária, entre outros (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003).

4.6.1 Integridade de membrana plasmática

Um aspecto fundamental no processo de avaliação seminal, que é em grande parte negligenciado pelos métodos descritivos, é a determinação da integridade estrutural e funcional das membranas lipoprotéicas dos espermatozoides (WATSON, 1995).

A membrana espermática tem um importante papel nos processos de capacitação e fertilização do oócito e sua constituição bioquímica é um dos principais pontos de interesse do estudo da fisiologia e patologia espermática (KUMI-DIAKA, 1994; LENZI et al., 1996). Ela é basicamente composta por ácidos graxos e proteínas (FLESH; GADELLA, 2000). Teorias sobre a fusão de membranas (oócito/espermatozoide) sugerem que a fluidez da membrana é pré-requisito para a função normal da célula, e que, a fluidez e a flexibilidade das membranas celulares são dependentes da sua composição lipídica (LENZI et al., 2002).

Vários testes foram desenvolvidos para a avaliação da integridade da membrana plasmática, e entre eles, podemos citar: o teste hipo-osmótico; o uso de sondas fluorescentes; e a eosina-nigrosina, sendo este último, por sua praticidade e custo, o método rotineiramente mais utilizado para esta finalidade (JEYENDRAN et al., 1984; KUMI-DIAKA; BADTRAM, 1994).

Teoricamente, a integridade da membrana em uma célula viva impede a impregnação de colorações, o que não acontece em células mortas cujas membranas estão alteradas (WHO, 1992). A proporção entre células coradas e não coradas de uma determinada amostra (porcentagem de células mortas e vivas, respectivamente), através do método de coloração Eosina/Nigrosina (E/N), foi descrita para o sêmen de diversas espécies, como suínos, caprinos, cães e felinos (POTO et al., 2000; LILY-PALOMINO et al., 2001; AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2003; PEÑA, NÚÑEZ-MARTÍNEZ; MORÉN, 2006).

4.6.2 Integridade acrossomal

O acrossomo é um dos principais componentes da célula espermática, visto ser ele o responsável pela fusão do espermatozóide com o oócito (BELFORD, 1983).

Porém, para que o espermatozóide adquira a habilidade de fecundar o oócito e iniciar o desenvolvimento embrionário, é necessário que ele passe por uma série de eventos, como o transporte para o oviduto, a capacitação, a ligação com a zona pelúcida, a reação acrossomal e a ativação do oócito (HERRICK; SWANSON, 2003).

Segundo Yanagimachi (1994),

[...] a capacitação espermática é um pré-requisito para a reação acrossomal na maioria dos mamíferos, que consiste na fusão entre a membrana externa do acrossomo e a porção da membrana plasmática que o envolve, levando à liberação das enzimas acrossomais.

Fisiologicamente, esta reação ocorre quando o espermatozóide entra em contato com a zona pelúcida, permitindo a penetração na mesma e a fusão com a membrana plasmática do oócito (YANAGIMACHI, 1994). Se a capacitação não ocorrer no seu devido tempo a fertilização estará comprometida, o que geralmente acontece quando o sêmen apresenta alterações acrossomais (LONG et al., 1996).

As membranas de algumas organelas, assim como as do acrossomo, são especialmente sensíveis aos danos causados pelo resfriamento (WATSON, 1995). Desta maneira, é muito importante avaliar a integridade dessas membranas ao se estudar novas metodologias de refrigeração do sêmen (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

A avaliação da integridade da membrana acrossomal pode ser feita observando suas alterações morfológicas (microscopia eletrônica) ou através de testes funcionais,

lançando-se mão do uso de corantes ou de sondas fluorescentes (TALBOT; CHACON, 1981; POPE; ZHANG; DRESSER, 1991; HARAYAMA; KUSUNOKI; KATO, 1993).

No caso dos *Felídeos*, a avaliação acrossomal é dificultada pelo fato dessas espécies apresentarem um acrossomo estreito e de difícil visualização (DONOGHUE et al., 1992; HOWARD, 1993). Diante disso, Pope, Zhang e Dresser (1991) desenvolveram um método simples e rápido para a coloração desta organela, comprovando sua eficácia para a avaliação da integridade acrossomal do espermatozóide de gato doméstico (*F. catus*), gato-do-deserto-indiano (*F. silvestris ornata*), do gato selvagem (*F. chaus*) e do leopardo-das-neves (*P. uncia*). Desde então, esta coloração vem sendo cada vez mais utilizada para avaliação da integridade acrossomal de espermatozóides de diversas espécies (SPINDLER et al., 2004; LUVONI, 2006).

4.6.3 Atividade citoquímica mitocondrial

Assim como a integridade estrutural das membranas, a motilidade da célula espermática também exerce um papel fundamental na fertilização (KATO et al., 2001). A motilidade do espermatozóide é gerada basicamente pelo movimento flagelar de sua cauda, sendo este um dos parâmetros mais utilizados para a avaliação da qualidade de determinada amostra de sêmen, e, este movimento exige um gasto energético alto, sendo a desfosforilação do adenosina tri-fosfato (ATP) a principal fonte de energia consumida neste processo (SALISBURY; LODGE; VAN DEMARK, 1978). A célula espermática produz altas quantidades de ATP através das mitocôndrias da peça intermediária (WOOLLEY, 1971).

Durante a espermatogênese ocorre uma série de mudanças na peça intermediária, como a disposição helicoidal das mitocôndrias ao redor do flagelo, a divisão das mitocôndrias em mitocôndrias esféricas e a disposição ponta-a ponta destas em duas hélices contíguas, que as permitem produzir toda a energia requerida durante o processo de fecundação (WOOLLEY, 1971; DE MARTINO; FLORIDI; MARCANTE, 1979).

Kramer et al. (1993), demonstraram a relação existente entre o status mitocondrial e a integridade da membrana com a fertilidade. Estes autores afirmam que, "junto com a motilidade, o status mitocondrial e a integridade da membrana são fatores importantes para determinar a fertilidade". Mais tarde, Vetter et al. (1998), reportaram que "o status mitocondrial pode ser útil em estudos toxicológicos do sêmen, especialmente aqueles que envolvem componentes que podem alterar o metabolismo energético sem afetar a integridade da membrana".

Estudos para mensurar a atividade respiratória evidenciaram que a atividade mitocondrial está envolvida no processo de oxidação e produção de energia ao espermatozóide (KATO et al., 2001). A avaliação da atividade mitocondrial pode ser realizada utilizando-se testes tais como a Rodamina 123, o JC-1 e o Mito-tracker®, entre outros (CELEGHINI et al., 2007). No entanto, na maioria das vezes, estes testes, por utilizarem fluorescência, se tornam muito dispendiosos e pouco práticos para sua utilização rotineira, visto que o material precisa ser analisado num curto espaço de tempo (CELEGHINI et al., 2007). Diante disto, Hrudka (1987) desenvolveu um ensaio citoquímico para demonstração qualitativa e quantitativa da atividade da enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) – enzima da cadeia respiratória responsável pela produção de energia do espermatozóide – através da 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

4.6.4 Integridade de DNA

A cromatina do espermatozóide de mamíferos é construída em um modelo conservativo que é extremamente compacto e estável, diferindo substancialmente das células somáticas (SHEN; ONG, 2000).

Estudos têm demonstrado que a organização anormal da cromatina espermática é mais freqüente em machos subférteis e inférteis (SAKKAS; TOMLINSON, 2000; SHEN; ONG, 2000; DONNELLY et al., 2001). Distúrbios na organização do material genômico do espermatozóide podem ter um sério impacto na fertilidade, pois, ainda que com seu material genético fragmentado, o espermatozóide pode vir a fecundar o oócito podendo causar problemas na prole ou mesmo em gerações futuras (HAINES, 2001; HUGES et al., 1999). Segundo Aitken (1999), “mesmo as amostras espermáticas com resposta satisfatória em testes de penetração, poderiam gerar, por exemplo, indivíduos com maior susceptibilidade a doenças ou anormalidades de desenvolvimento”.

Nos últimos 25 anos, foram desenvolvidos diversos métodos para a avaliação de fragmentação de fitas de DNA espermático “*in situ*”, sendo que os quatro principais testes para tal avaliação, são: o Ensaio TUNEL (“*Terminal Uridine Nick End Labelling*”); o Ensaio SCSA (“*Sperm Chromatin Structure Assay*”); e o SCGE (“*Single-Cell Gel Electrophoresis*”), também chamado de Ensaio Cometa (EVENSON; WIXON, 2006).

O Ensaio TUNEL é um método enzimático de detecção da fragmentação de DNA resultante da cascata de sinalização apoptótica no qual a presença da fragmentação é identificada pela TdT (Transferase deoxinucleotidil Terminal), uma enzima que irá catalisar a adição do nucleotídeo dUTP (*deoxiuridina trifosfatada*) conjugado a uma fluoresceína à região livre do grupo 3' hidroxil. (GAVRIELI; SHERMAN; BEM-SASSON,

1992; PAULA-LOPES, HANSEN, 2002). Durante anos, a técnica teve sua acurácia questionada, pois o protocolo original também poderia marcar as células necróticas, além das apoptóticas (GRASL-KRAUPP et al., 1995). Hoje em dia, com a técnica melhorada, é possível identificar apenas as células na fase final da apoptose (NEGOESCU et al., 1996, 1998).

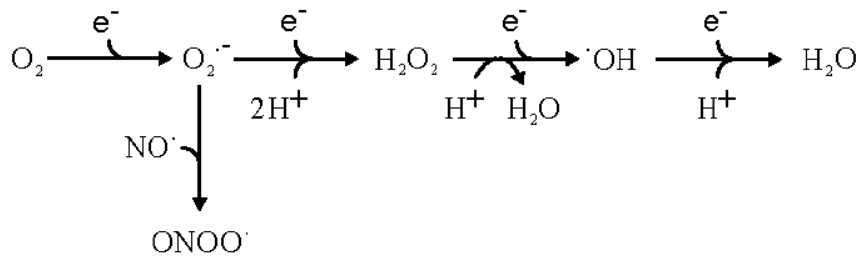
O Ensaio SCSA faz a determinação quantitativa da integridade da cromatina espermática, definida pela susceptibilidade do DNA à desnaturação ácido-induzida "*in situ*" (LARSON et al., 2000). Para esta técnica, uma solução de baixo pH desnatura o DNA nos espermatozoides com a cromatina alterada (o que não acontece com a cromatina intacta), e com o uso de um corante fluorescente intercalante pode-se fazer a determinação através da citometria de fluxo (EVENSON; JOST, 1994).

O Ensaio Cometa (EC), inicialmente desenvolvido para estudos toxicológicos, se baseia em princípios da eletroforese associada ao uso de corantes intercalantes fluorescentes, sendo o único capaz de mensurar o grau de fragmentação do DNA de cada célula individualmente (DUTY et al., 2002). Por este motivo, SAKKAS e TOMLINSON (2000), afirmam que "o Ensaio Cometa não pode deixar de ser usado em exames prognósticos de fertilidade". O EC também já foi reportado como ferramenta para avaliar os danos provocados pela criopreservação e pelo estresse oxidativo sobre a célula espermática (SAKKAS; TOMLINSON, 2000; SHEN; ONG, 2000; DONNELLY et al., 2001; ONG; SHAN; CHIA, 2002).

4.7 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre o nível de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, "*Reactive Oxygen Species*") e o grau de proteção dos mecanismos antioxidantes (ONG; SHAN; CHIA, 2002).

Entre as espécies reativas de oxigênio, as mais importantes são o radical hidroxila (OH^\cdot), o ânion superóxido (O_2^\cdot), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o óxido nítrico (NO_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Dentre estas, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as ROS formadas primariamente, sendo o H_2O_2 gerado através da dismutase (enzimática ou não enzimática) do ânion superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). A ROS mais reativa e prejudicial é o radical hidroxila (OH^\cdot), que pode ser formado através do H_2O_2 e do ânion superóxido, e através da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, produzindo o peroxinitrito (OONO^\cdot), que então irá se decompor para NO_2 e OH^\cdot (Esquema 1) (HALLIWELL, 1991).



Esquema 1- Formação das espécies reativas de oxigênio (NICHI, 2003)

4.7.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e o espermatozóide

O estresse oxidativo é considerado como uma das causas mais freqüentes da disfunção espermática (AITKEN et al., 1998); além de ser um dos principais fatores associados à perda na fertilidade de amostras de sêmen durante sua manipulação e armazenamento, principalmente quando utilizadas técnicas que necessitam da retirada do plasma seminal (BALL et al., 2001; CALAMERA et al., 2001; WATSON, 2001; AITKEN; BAKER, 2002). Estudos indicam que a perda de qualidade de amostras espermáticas, criopreservadas ou sob refrigeração, pode estar relacionada ao estresse oxidativo (AURICH et al., 1997; BAUMBER et al., 2000).

Desde a primeira metade da década de 40 há relatos de que os ROS diminuem a motilidade espermática, e mais adiante, que os radicais livres são produzidos tanto por espermatozóides normais quanto por anormais, entretanto os normais possuem mecanismos de defesa que previnem o dano celular (SULEIMAN et al., 1996).

Lewis et al. (1997), em um estudo com homens férteis e inférteis, observaram um aumento na produção de ROS em 40% dos inférteis, porém, nos férteis, não foi possível a sua detecção pelas metodologias utilizadas. Pasqualotto et al. (2000), afirmam que "40 a 80% dos pacientes inférteis apresentam altos níveis de oxigênio reativo seminal, independente da causa da infertilidade".

Estudos verificaram que o espermatozóide é particularmente susceptível ao ataque das ROS (JONES; MANN, 1977). Acredita-se que tal fato deve-se à pequena quantidade de citoplasma na célula espermática normal, o que limita a quantidade de antioxidantes, principalmente os enzimáticos (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004). Além disso, a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados na membrana espermática, o que permite a fluidez necessária para os eventos associados à fertilização, torna os espermatozóides

ainda mais vulneráveis (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; LENZI et al., 2000; AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003). As ROS atacam as ligações duplas (insaturações) nestas moléculas, enfraquecendo a ligação carbono-hidrogênio no átomo de hidrogênio adjacente, tornando-o suscetível à clivagem (SHARMA; AGARWAL, 1996). Sendo assim, devido à sua alta reatividade, produzem extensivos danos a proteínas, além de modificações de citoesqueleto e alterações de mecanismos celulares (SHARMA; AGARWAL, 1996). Neste sentido, Jones e Mann (1977), já haviam relatado que “a oxidação espermática é acompanhada por alterações estruturais na região acrossômica, diminuição da motilidade e perda de constituintes intracelulares”.

Mais tarde, alguns estudos demonstraram que a presença do oxigênio reativo em excesso também está associada à diminuição na concentração, e ao aumento de alterações morfológicas de peça intermediária, que prejudicariam a capacitação espermática e a reação acrossomal (SHARMA; AGARWAL, 1996; SULEIMAN et al., 1996; LEWIS et al., 1997; HSU et al., 1998; PASQUALOTTO et al., 2000). Alterações mitocondriais, danos estruturais no DNA, perda da integridade de membrana e inativação de enzimas também têm sido correlacionadas com a formação de lipo-peróxidos – radicais livres de oxigênio ligados a lipídeos (JONES; MANN, 1977; BECONI et al., 1991; AITKEN et al., 1998).

A relação entre a célula espermática e as ROS vai mais além. Segundo Engel, Schreiner e Petzoldt (1999), “espermatozoides imóveis e espermatozoides morfológicamente normais, porém funcionalmente anormais, também são fontes de ROS”. Rhemrev et al. (2001), verificaram que a produção de ROS por espermatozoides imóveis, funcionalmente e/ou morfológicamente anormais, ocorre provavelmente devido à inativação dos sistemas antioxidantes destas células.

Autores também sugerem que a oxidação dos fosfolipídios de membrana pode ser responsável pela diminuição do tempo de vida do espermatozoide na fêmea, bem como pela diminuição da qualidade do sêmen congelado e/ou resfriado utilizado na inseminação artificial (BECONI et al., 1991; HSU et al., 1998).

O mecanismo de ação das ROS na fisiologia normal do espermatozoide ainda não foi completamente elucidado, porém os resultados dos experimentos que vêm sendo realizados convergem para a definição de que os processos de hiperativação, capacitação, ligação com a zona pelúcida e reação acrossômica sejam processos oxidativos ou regulados por redução (AITKEN; CLARKSON, 1988; AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989; AITKEN et al., 1989; RAO et al., 1989; IWASAKI; GAGNON, 1992; AGARWAL; IKEMOTO; LOUGHLIN, 1994; NICHI, 2003).

4.7.2 Mecanismos de proteção antioxidantes seminais

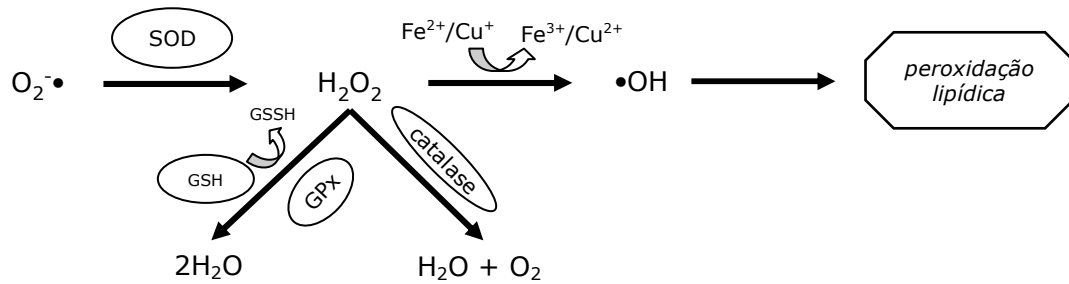
O organismo desenvolveu mecanismos para proteger-se do processo oxidativo e as substâncias que participam destes processos receberam o nome de antioxidantes. Dentre as substâncias classificadas como agentes antioxidantes estão vitaminas, minerais e enzimas (MACHLIN; BENDICH, 1987). Os antioxidantes naturais podem restabelecer o balanço entre as moléculas oxidantes e antioxidantes no organismo, mantendo assim a integridade das membranas celulares e prevenindo o dano oxidativo ao DNA (WOUNG et al., 2000).

O sistema enzimático de proteção das membranas celulares contra a peroxidação lipídica é composto basicamente por três enzimas: a glutationa peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (AITKEN et al., 1996; LENZI et al., 1996; BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999), sendo que existe uma associação entre a peroxidação lipídica e as enzimas antioxidantes (DANDEKAR et al., 2002).

O sistema de proteção de membranas não enzimático é composto basicamente pelas vitaminas E (tocoferol) e C (ascorbato), que são capazes de reparar os radicais oxidados e assim impedir a cascata oxidativa (BUETTNER, 1993).

As vitaminas E e C atuam conjuntamente na proteção das membranas lipídicas contra o dano oxidativo, sendo que a vitamina E oxida-se e interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica de biomembranas e lipoproteínas (HSU et al. 1998). A vitamina C transfere as ROS da fase aquosa para a cadeia transportadora de elétrons e assim inibe a peroxidação lipídica, além de reciclar a vitamina E oxidada (radicais tocoferil), tornando-a novamente ativa (HSU et al., 1998).

Durante o processo de maturação o espermatozóide perde citoplasma, perdendo assim parte dos mecanismos endógenos de reparo e as defesas enzimáticas, que são observadas nos outros tipos celulares (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999). Contudo, ele é protegido do ataque oxidativo pelo plasma seminal que contém enzimas e moléculas antioxidantes, como as vitaminas E e C, superóxido dismutase e a catalase (LEWIS et al., 1997; HSU et al., 1998; DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999). De acordo com alguns autores, a capacidade antioxidante total do plasma seminal é maior em homens férteis (LEWIS et al., 1997; PASQUALOTTO et al., 2000).



Esquema 2: Mecanismo de ação do sistema enzimático de proteção antioxidante

4.7.3 Tratamento antioxidante

Segundo Halliwell e Gutteridge (1989), “define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas com às de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação deste substrato”.

Apesar de reconhecida a importância dos antioxidantes na prevenção do estresse oxidativo no sêmen, ainda há controvérsias sobre a importância de cada uma das enzimas envolvidas na prevenção dos danos causados pelo estresse oxidativo (NICHII, 2003). Tais controvérsias surgem pelo fato de que as ROS desempenham um papel importante no processo fisiológico normal do espermatozóide, regulando a taxa de hiperativação, atuando na reação acrossômica e na fusão espermatozóide/oócito (AITKEN; IRVINE; WU, 1991; DE LAMIRANDE; EILEY; GAGNON, 1993; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; GRIVEAU; RENARD; LE LANNOU, 1994; KODAMA; KURIBAYASHI; GAGNON, 1996; DE LAMIRANDE et al., 1997; SENGOKU et al., 1998). Deste modo, um tratamento antioxidante pode ser benéfico ou deletério, de acordo com o tipo e a quantidade de antioxidante utilizado (NICHII, 2003).

Li et al. (1999), realizaram um estudo no qual os níveis testiculares de glutathione peroxidase foram mensurados em ratos após administração de cocaína. Neste experimento, os índices de estresse oxidativo, medido através dos níveis de malondialdeído – metabólito originado da peroxidação lipídica – aumentaram posteriormente à diminuição dos níveis de glutathione. Ainda neste estudo, os resultados sugerem que a produção de ROS no testículo, provocada pela cocaína, foi controlada pela glutathione peroxidase, e, com o consumo daquele antioxidante e os níveis ainda elevados de ROS, os índices de peroxidação lipídica testicular aumentaram. Os autores então concluem que a glutathione é um importante agente antioxidante em nível testicular.

Num outro estudo, Calamera et al., (2001), incubaram espermatozóides humanos por 48 horas, em meio de Ham F10 modificado, com e sem catalase, e observaram a

produção de níveis significativos de ROS. Neste experimento, as amostras tratadas com catalase não apresentaram melhora significativa.

Em um sistema de produção de ROS proposto por Twigg et al. (1998), a adição de NADPH, provável indutor de produção de ROS intracelular, provocou altos níveis de peroxidação lipídica e danos na motilidade e no DNA espermático. A nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) é uma coenzima semelhante à nicotinamida adenina dinucleótido, sendo o doador de elétrons nas reações da via das pentoses-fosfato, havendo redução da NADP^+ em NADPH (TWIGG et al., 1998). Neste experimento, a adição de SOD e catalase não foi eficaz na prevenção dos efeitos adversos das ROS. Segundo os autores, isso ocorreu provavelmente devido à indução da formação de ROS no interior da célula, indicando que os níveis de proteção antioxidante dependem dos locais de produção destes radicais e conseqüente peroxidação lipídica.

4.7.4 A Glutaciona

Segundo Nichi (2003), "as glutacionas peroxidases (GPx) são uma família de enzimas que podem ser divididas em dois grupos, as selênio-dependentes e as selênio independentes". As enzimas do grupo selênio-dependente podem decompor o H_2O_2 e vários hidro ou lipoperóxidos. Nesta reação, catalisada pela glutaciona peroxidase, a glutaciona reduzida (GSH, γ -glutamil-L-cisteinilglicina) é usada como co-substrato para metabolizar o H_2O_2 , resultando em H_2O e glutaciona oxidada (GSSG). A GSSG, por sua vez, pode ser reduzida novamente para GSH pela enzima glutaciona redutase (GRD), dependente do NADPH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). O mecanismo catalítico das GPx envolve a oxidação de seu sítio ativo selenolato para ácido selênico. Com a adição de uma molécula de GSH, o ácido selênico é transformado em seleniosulfídio agregado à glutaciona, que pode ser regenerado para o selenonato e glutaciona oxidada (GSSG) pela adição de uma segunda molécula de GSH. Deste modo, duas moléculas de GSH são oxidadas para GSSG que, subseqüentemente, podem ser reduzidas pela GRD, a enzima redutora de GSSG mais abundante em mamíferos (NORDBERG; ARNÈR, 2001).

As glutacionas selênio-dependentes podem ser divididas em quatro formas geneticamente distintas, GPx1, GPx2, GPx3 e GPx4. A GPx2 é encontrada no citosol e a GPx3, no meio extracelular, e são pouco detectadas na maioria dos tecidos, exceto trato gastrointestinal e rins. A GPx1 e a GPx4 são localizadas na maioria dos tecidos estando a GPx1 restrita às mitocôndrias e a GPx4 ao citosol e à membrana (MATÈS, 2000). A GPx1 provoca a redução de hidroperóxidos de ácidos graxos e H_2O_2 utilizando a GSH. Já a GPx4 pode reduzir diretamente hidroperóxidos de fosfolípidos, de ácidos graxos e de

colesterol, que são produzidos em membranas peroxidadas e lipoproteínas oxidadas (IMAI et al., 1998). A GPx1 é predominantemente presente em eritrócitos, rins e fígado e a GPx4 é altamente expressa nas células epiteliais renais e nos testículos (NICHII, 2003).

4.7.5 Mensuração do estresse oxidativo

Segundo Nichi (2003),

[...] muitas pesquisas têm sido feitas a fim de desenvolver índices de estresse oxidativo que possam identificar e quantificar, com acurácia, os efeitos desse processo sobre a infertilidade. Uma vez que, o estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a produção de ROS e a proteção oxidativa no sêmen, torna-se concebível que a avaliação do estresse oxidativo seja feita através da mensuração dos níveis de ROS e/ou seus metabólitos, assim como, dos níveis de antioxidante no sêmen.

Para a dosagem de ROS no sêmen são necessárias técnicas muito sensíveis, visto que a produção destes pelo sêmen é relativamente baixa quando comparada com a produzida por leucócitos, por exemplo, e, além disso, a meia-vida das ROS é muito curta (LUNEC, 1989; KESSOPOULO et al., 1994). Para mensurá-las são usadas técnicas de quimioluminescência, que, mesmo sendo bastante sensíveis, não conseguem dosar níveis de ROS que ocorrem em amostras seminais de homens normais (SHEKARRIZ; THOMAS JR; AGARWAL, 1995; SHEKARRIZ et al., 1995). Pasqualotto et al. (2000), ressaltam que “a mensuração dos níveis de antioxidantes também pode ser realizada pela dosagem imunocitoquímica e pela dosagem enzimática”.

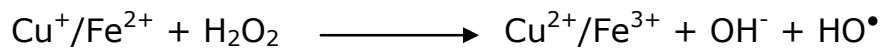
A dosagem de componentes oxidados que se mantém nos fluidos corporais é uma técnica mais específica, visto que avalia indiretamente o estresse oxidativo efetivamente ocorrido, e, um destes componentes, o malondialdeído (MDA), pode ser usado como um índice de peroxidação lipídica (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993a; SIDHU et al., 1998). A ocorrência da peroxidação lipídica em espermatozoides leva a um acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática espermática que posteriormente se decompõem para formar o MDA (SLATER, 1984; JANERO, 1990). A avaliação dos níveis de MDA tem sido extensivamente utilizada como marcador da peroxidação lipídica (SLATER, 1984; JANERO, 1990; NICHII, 2003).

Entre os diferentes métodos analíticos estabelecidos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado, sendo que nesta reação, o composto formado pela reação entre o MDA e o TBA pode ser mensurado através de sua absorbância ou fluorescência (NICHII, 2003).

Uma ferramenta importante e muito utilizada para a avaliação dos níveis de proteção antioxidante e de peroxidação lipídica é a geração artificial de ROS, o que permite avaliar dois aspectos: a peroxidação lipídica espermática e a disponibilidade de

hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática do espermatozóide, pelos quais iria se iniciar a reação peroxidativa em cadeia; e a habilidade do espermatozóide em inibir a propagação deste processo através de mecanismos antioxidantes (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993a).

Uma técnica frequentemente utilizada para provocar a peroxidação lipídica, é a indução pelo sistema sulfato de ferro (FeSO_4) + ácido ascórbico (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993b; GRIVEAU et al., 1995). Esta técnica se baseia na formação de metais de transição (Ferro e Cobre) que irão catalisar a quebra de hidroperóxidos pré-existentes iniciando a propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica promovida pelo ferro através da reação de Fenton (Esquema 3). O ácido ascórbico, por sua vez, provocaria a redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} , alimentando novamente a reação (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993b; ENGEL; SCHREINER; PETZOLDT, 1999).



Esquema 3: Reação de Fenton, adaptado de Nordeberg e Arnér (2001)

5 MATERIAL E MÉTODOS

"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário".

- Albert Einstein

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido nas instalações da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Reprodução Humana da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, e foi dividido em experimento 1 e experimento 2.

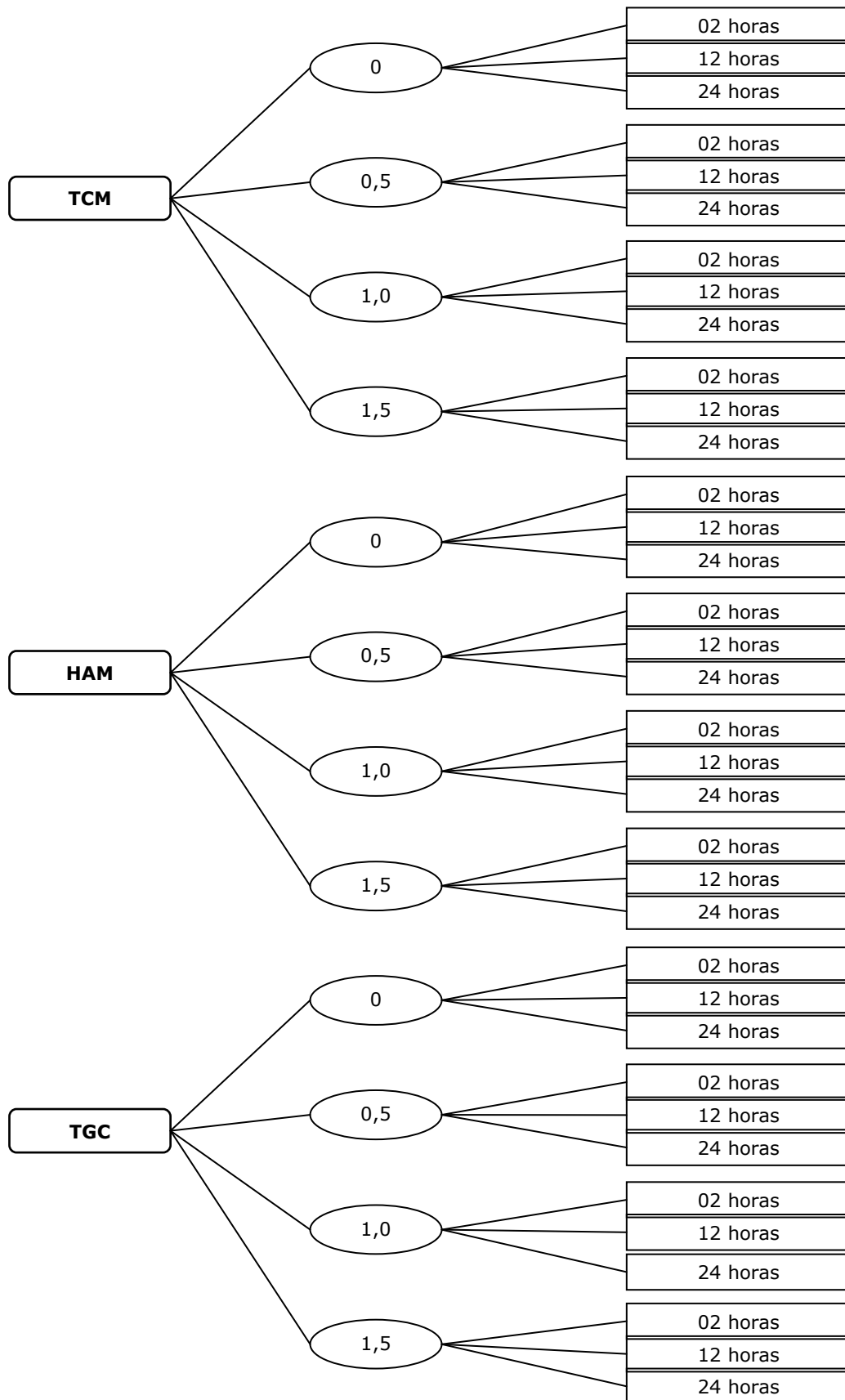
O experimento 1 constituiu-se no resfriamento de sêmen de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775) por 24 horas, tratado com três diluidores diferentes e quatro tratamentos antioxidantes, sendo as amostras avaliadas através de testes convencionais e funcionais, assim como, pela resistência dos espermatozóides ao estresse oxidativo por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

No experimento 2, o diluidor que apresentou os melhores resultados para as variáveis avaliadas no Experimento 1 foi utilizado para verificar o efeito na integridade do material genético espermático, do tratamento antioxidante e do tempo de resfriamento.

5.1 Delineamento experimental

O experimento 1 foi realizado seguindo um fatorial 3x4x3, sendo cada um dos fatores, respectivamente, três diluidores (TCM, HAM e TGC), quatro tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutathione reduzida (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM), e três tempos de resfriamento (2, 12 e 24 horas), totalizando 36 tratamentos (Esquema 4).

O experimento 2 foi realizado usando-se apenas o diluidor TGC e seguindo um fatorial 4x3, sendo cada um dos fatores, respectivamente, quatro tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutathione reduzida (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM), e três tempos de resfriamento (2, 12 e 24 horas), totalizando 12 tratamentos.



Esquema 4 – Representação gráfica do delineamento experimental utilizado no experimento

5.2 Animais

Foram utilizados 15 machos adultos de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775), mantidos em cativeiro pela Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – FPZSP.

Todos os animais do experimento estavam hígidos e mantidos sob as mesmas condições de manejo ambiental, alimentar e reprodutivo. Os recintos são localizados em local onde não há visitação do público e apenas pessoas da equipe técnica da instituição tem acesso. Quanto ao manejo alimentar, os animais são alimentados com carne bovina, pintos, sardinhas, codornas e ratos. O manejo reprodutivo é realizado de forma que os machos apenas são colocados em companhia de fêmeas conforme a intenção do zoológico de obter crias, caso contrário os machos ficam sozinhos ou acompanhados de outros machos em seus recintos.

A formação dos grupos para a coleta foi estipulada pelo zoológico de forma que o jejum prévio e a contenção não prejudicassem o manejo ou interferissem na rotina. Porém, foram tomadas medidas para que os animais pudessem ser separados em grupos de três a quatro indivíduos por coleta, sendo que as coletas fossem realizadas semanalmente, com um intervalo mínimo de um mês entre coletas de um mesmo animal.



Figura 1 - Gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)².

²Fonte: <<http://www.naturezaselvagem.hpg.ig.com.br/fotos/Animais/gato-do-mato-pequeno.jpg>>. Acesso em janeiro de 2005.

5.3 Contenção e anestesia

Os animais eram retirados de seus recintos e transportados até a Divisão de Veterinária da FPZSP em caixas de transporte. Em seguida, eram passados para uma caixa de contenção com parede móvel, para que fossem pesados e submetidos à contenção química, administrada pela via intramuscular. A medicação utilizada foi a quetamina (10mg/kg), associada ao cloridrato de xilazina (1mg/kg). Após a contenção química, com o estabelecimento do plano anestésico desejado, o animal era acomodado na sala onde se realizaram os procedimentos. Encerrado o procedimento, os animais eram novamente acomodados em caixas de transporte e o retorno da anestesia monitorado, sendo por fim, realojados em seus recintos quando aptos para tal.

5.4 Colheita do sêmen

Uma vez realizado o exame da genitália, os animais foram submetidos ao procedimento de eletroejaculação para obtenção do sêmen. O aparelho utilizado foi o modelo Torjet 65C[®] (Eletrovet), que permite controle da voltagem dos estímulos elétricos entre 0 e 12V, segundo recomendado por Platz e Seager (1978). Foi utilizado um eletrodo retal bipolar (probe), desenvolvido de acordo com as características anatômicas da espécie, fabricado em plástico rígido, e apresentando três linhas metálicas longitudinais de cobre para propagação dos estímulos elétricos, como preconiza Howard (1993). Antes de proceder com os estímulos elétricos o pênis era posicionado dentro de um frasco plástico do tipo Eppendorf[®] pré-aquecidos a 37°C.

O procedimento de eletroejaculação baseou-se nos métodos descritos na literatura (PLATZ; SEAGER, 1978; HOWARD, 1993). Desta maneira, a probe era lubrificada com gel de carboximetilcelulose e introduzida no reto do animal com as linhas metálicas posicionadas ventralmente, massageando-se a região com o objetivo de aumentar o estímulo do plexo pélvico. Com a probe posicionada, eram realizadas 3 séries de 10 estímulos cada, inicialmente com 2V, aumentando-se gradativamente 1V a cada série, e iniciando uma nova série com a voltagem final da última série, totalizando 80 estímulos, como mostra a sequência abaixo:

- primeira série de 30 estímulos: 10 de 2V, 10 de 3V e 10 de 4V;
- segunda série de 30 estímulos: 10 de 3V, 10 de 4V e 10 de 5V);
- terceira e última série: 20 estímulos (10 de 4V e 10 de 5V).

Imediatamente após a eliminação de qualquer material pelo animal após um estímulo, o frasco era trocado prevenindo-se possível contaminação por urina. Caso terminada uma série sem que fosse obtido um ejaculado, um intervalo de três minutos era realizado antes do início da próxima série.

Se o animal apresentasse uma boa resposta aos estímulos de uma determinada voltagem, a série seguia sem o aumento da voltagem até que se completassem os números totais de estímulos programados. Quando ocorriam interrupções inesperadas no protocolo, este se reiniciava na mesma voltagem anterior à pausa, a menos que o animal não respondesse positivamente aos estímulos. No entanto, se os ejaculados fossem considerados suficientes para a condução do experimento, mesmo que não finalizado, o protocolo de eletroejaculação era interrompido evitando uma estimulação desnecessária do animal.

5.5 Processamento do sêmen

Imediatamente após a obtenção de uma amostra, a mesma era observada para detectar alterações perceptíveis macroscopicamente, tais como alterações da coloração e presença de urina. Era também realizada uma análise microscópica prévia, considerando-se apenas a presença de células móveis.

Os ejaculados obtidos de um animal eram misturados e divididos em quatro alíquotas iguais, e, cada uma das alíquotas colocadas em criotubos contendo os diferentes diluidores e acondicionadas a 37°C em banho-maria. Os ejaculados dos outros animais do mesmo grupo eram também adicionados a estes criotubos formando um "pool", considerado como unidade experimental. A viabilidade do pool era avaliada através de uma análise microscópica subjetiva. Para isto, 5µL de sêmen era colocado entre lâmina e lamínula, ambas previamente aquecidas em placa (37°C) e observadas quanto à motilidade, ao vigor e à concentração, sobre platina aquecida (37°C), no microscópio de luz, sob aumento de 10 vezes. No total, foram formados 9 "pools", resultando em 3 repetições para cada diluidor.

Para este experimento foram testados três diluidores:

- Meio de Cultivo Celular de Earle® TCM 199(TCM) ³;
- Meio de Cultivo Celular de HAM F10® (HAM) ⁴;
- Diluidor preparado com Tris-gema-citrato (TGC) ⁵.

³ TCM: Earle's TCM 199, Nutricell Nutrientes Celulares (Campinas, SP)

⁴ HAM: Ham's F10 com albumina sérica bovina, Nutricell Nutrientes Celulares (Campinas, SP)

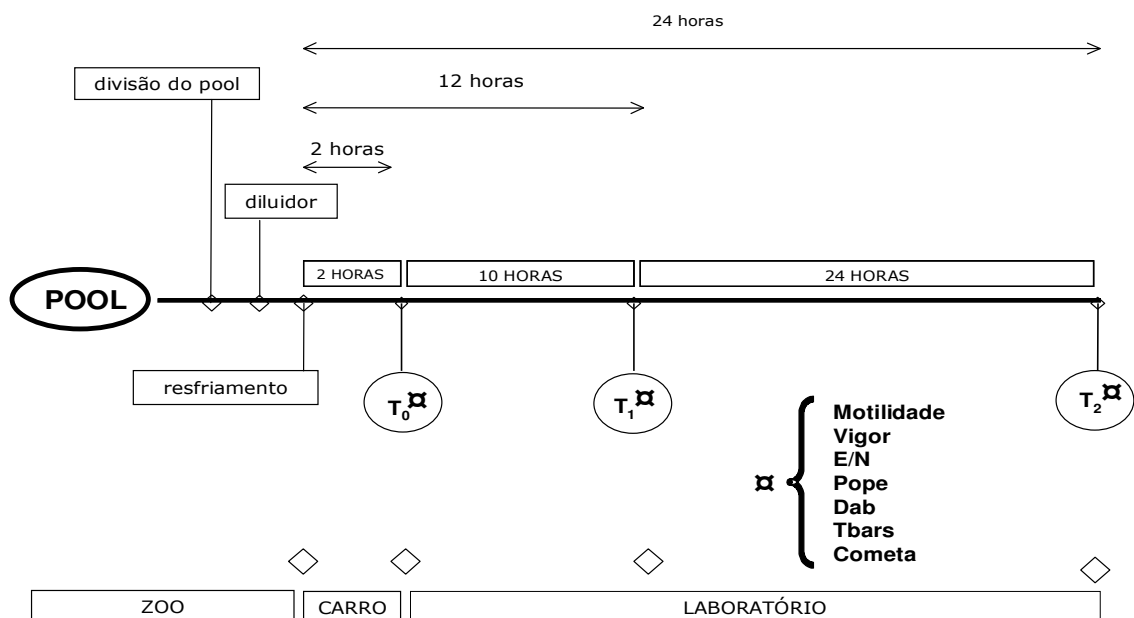
⁵ TGC: 3g Tris, 1,7g ácido cítrico, 1,25g frutose, 0,02mg amicacina, 20% gema de ovo (v/v).

Cada um dos diluidores foi previamente preparado com quatro concentrações diferentes de glutathiona reduzida⁶ (GSH), foram elas: 0mM (controle); 0,5mM; 1,0mM e 1,5mM.

Após as alíquotas serem distribuídas em seus respectivos diluidores, as mesmas eram submetidas ao resfriamento numa curva de $-0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingirem 4°C . O resfriamento realizava-se acomodando os criotubos contendo as amostras em um recipiente com água a 37°C , que por sua vez, era acondicionado em um isopor com gelo picado.

A partir de duas horas de incubação, tempo necessário para o sêmen atingir a temperatura de 4°C , as amostras eram avaliadas quanto à motilidade, vigor, integridade acrossomal, integridade da membrana plasmática e ao grau de atividade mitocondrial da peça intermediária. Também eram avaliadas quanto à resistência ao estresse oxidativo, através da mensuração da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, e quanto à integridade do DNA. As mesmas avaliações eram realizadas após 12 e 24 horas de incubação do sêmen a 4°C em refrigerador com temperatura controlada (Esquema 5).

As amostras diluídas em TGC eram centrifugadas a $600 \times g$ por 5 minutos e ressuspendidas em PBS para a retirada do diluidor antes de serem processadas.



Esquema 5 – Representação gráfica do processamento das amostras

⁶ Acros Organics® (32022-5000)

5.6 Testes Convencionais

Os testes convencionais utilizados neste experimento foram motilidade e vigor espermático, através dos quais foi calculado o índice de motilidade espermática.

5.6.1 Avaliação da Motilidade Espermática

A motilidade foi então classificada, numa escala entre 0 e 100%, segundo a proporção de espermatozóides móveis nos campos observados sob aumento de 100 vezes em microscópio convencional, sendo 0% para nenhum espermatozóide móvel no campo e 100% para todos os espermatozóides móveis.

5.6.2 Avaliação do Vigor Espermático

O vigor foi avaliado quanto ao movimento progressivo retilíneo dos espermatozóides numa escala de 0 a 5, na qual, 0 representa ausência de movimento e 5 representa movimentos progressivos intensos.

5.6.3 Índice de Motilidade Espermática

Segundo Howard (1993), com os valores de motilidade e vigor é possível calcularmos uma taxa de motilidade geral denominada Índice de Motilidade Espermática (IME), utilizando-se a fórmula:

$$\text{IME} = [\% \text{ espermatozóides móveis} + (20 \times \text{vigor})] / 2.$$

5.7 Testes Funcionais

Os testes funcionais utilizados neste experimento foram a avaliação da integridade das membranas acrossomal e plasmática, avaliação da atividade mitocondrial e avaliação da integridade do DNA espermático.

5.7.1 Avaliação da Integridade Acrossomal

Visando monitorar os possíveis danos causados durante o resfriamento das amostras, a técnica da Coloração Simples de Pope (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991) foi utilizada para a avaliação da integridade estrutural da membrana acrossomal.

Para tanto, a cada tempo de resfriamento, uma alíquota de cada amostra (5 μ l) foi adicionada ao Corante Simples de Pope (5 μ l), sendo a mistura incubada por 70 segundos. Após incubação, foram feitos esfregaços sobre lâminas de microscopia, os quais foram analisados em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como:

Acrossomo Íntegro: região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura que a região pós-acrossomal (Figura 2);

Acrossomo Não-íntegro: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossomal (Figura 3).



Figura 2 - Espermatozóide com acrossomo íntegro. Coloração Simples de Pope. Obj. 100x.

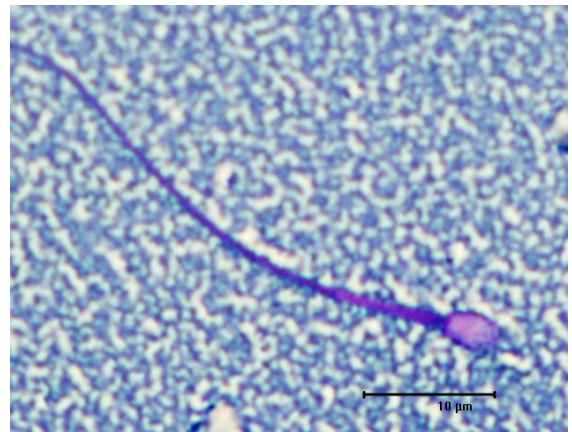


Figura 3 - Espermatozóide com acrossomo não-íntegro. Coloração Simples de Pope. Obj. 100x.

5.7.2 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N) segundo Barth e Oko (1989). Nesta coloração, por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozóides, a eosina cora estas células de rosa. Os espermatozóides com membranas íntegras não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas. Desta maneira, uma alíquota de sêmen (5 μ l) foi misturado ao corante na proporção de 1:1 e realizados esfregaços sobre lâminas de microscopia. As lâminas foram analisadas em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como células com membrana não-íntegra (coradas; Figura 4) e íntegra (não coradas; Figura 5).



Figura 4 - Espermatozóide com a membrana plasmática não íntegra. Eosina-nigrosina. Obj. 100x.

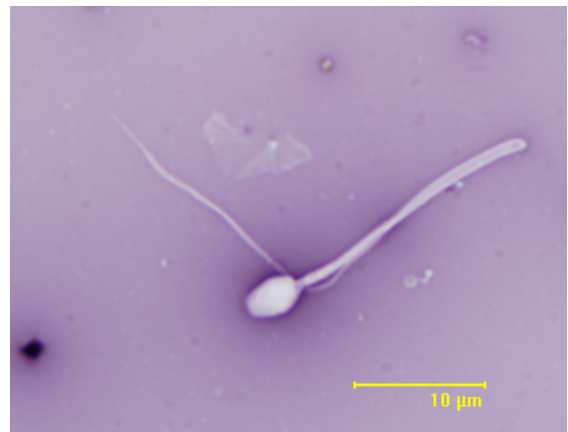


Figura 5 - Espermatozóide com a membrana plasmática íntegra. Eosina-nigrosina. Obj. 100x.

5.7.3 Avaliação da Atividade Mitocondrial

Segundo Hrudka (1987), a enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células, além de ser pré-requisito para as funções osmótica e sintética, para a motilidade e manutenção da estrutura celular. A técnica citoquímica desenvolvida por este autor baseia-se na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO. Através de uma reação em cadeia, o DAB é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, nas mitocôndrias. Esta deposição pode ser

identificada através de microscopia convencional pela sua coloração marrom. Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos a que os espermatozóides são submetidos.

Para realização desta técnica, uma alíquota de 25µL de amostra foi incubada com 25µL de DAB (1mg/ml de PBS), a 37°C, por uma hora. Também era feito um controle negativo com duração e condições idênticas, tendo sido previamente adicionado formol salino para inibir sua atividade mitocondrial. Após incubação, foram feitos esfregaços em lâmina de vidro e estas fixadas em formol a 10% por 10 minutos. As lâminas foram então lavadas e secas no ar sob proteção da luz.

A atividade citotóxica da mitocôndria espermática foi avaliada segundo descrito por Hrudka (1987). Desta maneira, as lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase, sob aumento de 1000 vezes, em imersão. Foram contados 200 espermatozóides/lâmina e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em 4 classes:

- *Classe I*: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada, alta atividade mitocondrial (DAB I; Figura 6);
- *Classe II*: células espermáticas com segmentos corados (ativos) e não-corados (inativos), havendo predominância dos ativos (DAB II; Figura 7);
- *Classe III*: células espermáticas com segmentos corados (ativos) e não-corados (inativos), havendo predominância dos inativos (DAB III; Figura 7);
- *Classe IV*: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada, sem atividade mitocondrial (DAB IV; Figura 6).



Figura 6 – Espermatozóides DAB I (direita) e DAB IV (esquerda). Diaminobenzidina. Obj. 100x.



Figura 7 – Espermatozóides DAB II (direita) e DAB III (esquerda). Diaminobenzidina. Obj. 100x.

5.7.4 Avaliação da integridade do DNA espermático

Para avaliar a integridade do DNA nuclear espermático realizou-se a técnica de eletroforese de célula única em gel de agarose, em solução alcalina, ou Ensaio Cometa Alcalino, adaptado de Donnelly, McClure e Lewis et al. (2000). Esta técnica é capaz de detectar quebras em fita simples de DNA em sítios álcali sensíveis. As células adquirem morfologia similar à de um cometa, no qual a cauda representa os fragmentos de DNA que migraram durante a eletroforese.

As amostras destinadas para este teste eram aliqüotadas (250µL) e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido nos tempos 2, 12 e 24 horas (DUTTY et al., 2002).

Para esta técnica, duas lâminas por amostra eram preparadas previamente com 1000µL de Agarose "Normal Melting Point" (NMPA) a 1% em TBE (0.089M Tris, 0.089M Borato, 0.002M EDTA) e mantidas a 4°C. Em cada lâmina era adicionado 100µL de uma alíquota da amostra diluída em Agarose "Low Melting Point" (LMPA) a 0,75% em TBE para uma concentração final de 1×10^6 /mL. As lâminas eram cobertas por lamínulas e mantidas a 4°C para solidificação. Após 10 minutos, as lamínulas eram removidas gentilmente e 300µL de LMPA 0,75% em TBE serão adicionados. Novamente, as lâminas eram cobertas por lamínulas e mantidas assim por 10 minutos a 4°C. Após a remoção das lamínulas, as lâminas eram cobertas com 2mL de solução de lise gelada (100mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 2,5M NaCl, 2% Triton X-100, 4mM DTT, pH=11,0) por, no mínimo, 2 horas a 4°C. As lâminas eram então lavadas com água Milli-Q por 10 minutos para remover o excesso de sais e em seguida imersas em solução alcalina de eletroforese (300mM NaOH, 1mM Na₂-EDTA, pH>13.0) por 20 minutos. A eletroforese era realizada por 20 minutos a 1,5V/cm e à uma intensidade de corrente menor que 270 mA. Posteriormente, as lâminas eram lavadas com TBE (2 vezes, por 5 minutos), com água Milli-Q (1 vez, por 5 minutos) e fixadas (3 vezes, por 2 minutos) em etanol. Em seguida, as lâminas eram coradas com Brometo de Etídeo (1µL de EtBr - 10mg/mL diluído em 1,5mL de TBE por lâmina ou 20µg/mL). Após 15 minutos, as lâminas eram novamente lavadas com TBE (3 vezes, por 15 minutos) para remover a coloração de fundo. As lâminas eram observadas utilizando-se um microscópio de epifluorescência⁷ equipado com um filtro de excitação de 510-560nm, um espelho dicróico de 565nm e um filtro de barreira de 590nm, em aumento de 400x.

Um total de 200 espermatozóides/lâmina era classificado de acordo com a intensidade do dano no DNA observado pela cauda e intensidade nuclear, sendo divididos nas seguintes classes:

⁷ G-2A, Nikon, Japão

- *Classe I*: Células com halo ao seu redor e núcleo corado, porém sem cauda de cometa evidente, indicando pouca fragmentação no DNA (COMETA I; Figura 8);
- *Classe II*: Célula com formação de cauda e com núcleo pouco descorado, indicando danos leves no DNA (COMETA II; Figura 9);
- *Classe III*: Célula com cauda de cometa já formada, porém com núcleo ainda parcialmente corado, indicando danos evidentes no DNA (COMETA III; Figura 10);
- *Classe IV*: Célula com núcleo completamente descorado e apenas a cauda do cometa, indicando fragmentação intensa do DNA (COMETA IV; Figura 11).



Figura 8 – Espermatozóide COMETA I. Brometo de etídeo. Obj. 100x.

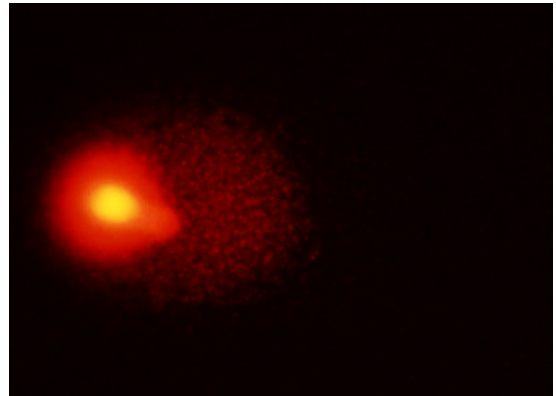


Figura 9 – Espermatozóide COMETA II. Brometo de etídeo. Obj. 100x.

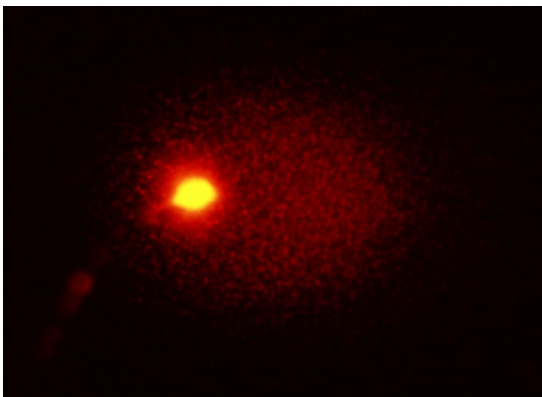


Figura 10 – Espermatozóide COMETA III. Brometo de etídeo. Obj. 100x.

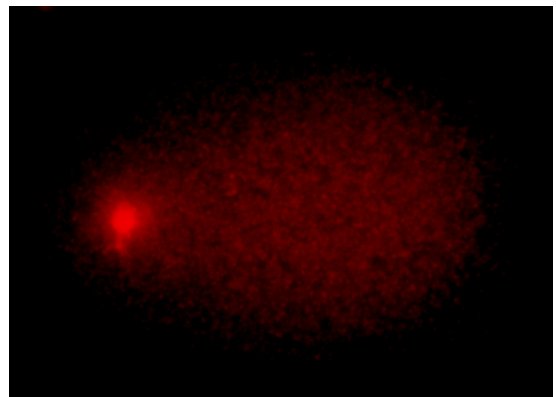


Figura 11 – Espermatozóide COMETA IV. Brometo de etídeo. Obj. 100x.

5.8 Avaliação do Índice de Resistência ao Estresse Oxidativo

As determinações baseiam-se na metodologia descrita por Ohkawa et al. (1979), que tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação de lipídeos. Foi utilizado

um sistema gerador de ROS com posterior mensuração da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) através da espectrofotometria, mensurando-se, portanto, a susceptibilidade das células à peroxidação lipídica.

A cada tempo (2, 12 e 24 horas sob refrigeração), uma alíquota de 500µl da amostras era submetido à incubação (90 minutos, 37°C) com o sistema de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) formado pelo ácido ascórbico (125µL, 20mM) e o sulfato de ferro (125µL, 20mM).

Após o período de incubação, foram adicionados 1500µL de solução de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%) e centrifugadas por 15 minutos, sob temperatura de 15°C e 5000 x g, para precipitação de proteínas.

Alíquotas de 500µL do sobrenadante são colocadas em tubos de ensaio juntamente com 500µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA, 1%), dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH 0,05M), preparado instantes antes de ser utilizado. Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho-maria (90 a 100°C) por 15 minutos e resfriados imediatamente em banho de gelo, no intuito de parar a reação.

A concentração de TBARS foi quantificada através de leitura em espectrofotômetro⁸, num comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão feita previamente com malondialdeído.

O MDA é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e a concentração de TBARS é determinada utilizando-se o valor $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} mL^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do malondialdeído (BUEGE; AUST, 1978).

A concentração de TBARS nas amostras foi expressa em nanogramas de TBARS por 1×10^6 espermatozóides (ng/ 10^6 sptz).

5.9 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (2000).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformados (logarítmo na base 10 – $\log_{10} X$; Raiz quadrada – \sqrt{X} ; Quadrado – X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregados os erros padrões das médias e as médias (média \pm erro padrão da média) dos dados originais; e os níveis de significância

⁸Ultrospec 3300pro, Amersham Pharmacia

(p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas: dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta.

As variáveis resposta foram analisadas através da correlação de Pearson (PROC CORR) e Spearman (PROC CORR SPEARMAN), para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente, sendo os resultados expressos através do coeficiente de correlação (r) e seu nível de significância (p).

5.9.1 Análise estatística do Experimento 1

As variáveis classificatórias (fatores) utilizadas foram diluidores (TCM, HAM e TGC), tratamento antioxidante com GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) e tempo de refrigeração (2, 12 e 24 horas). Caso não fosse observada interação entre os três fatores (diluidor, tratamento antioxidante e tempo de refrigeração), cada um dos fatores foi analisado isoladamente (efeitos principais). Caso contrário, foram levados em conta os 36 tratamentos da interação (3 x 4 x 3), utilizando-se o PROC MIXED de medidas repetidas no tempo.

As variáveis resposta porcentagem de células classes I e II da coloração diaminobenzidina (DAB I e DABII); porcentagem de células com acrossomo íntegro pela coloração simples (POPE) obedeceram às premissas não sendo necessárias transformações.

As variáveis resposta substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); porcentagem de células classes III e IV do teste de atividade mitocondrial (DAB III, DAB IV) não obedeceram às premissas, tendo sido analisadas após a transformação de seus valores para o logaritmo na base 10.

As variáveis resposta Motilidade; Vigor; Índice de Motilidade Espermática; porcentagem de células com membrana íntegra pela coloração eosina/nigrosina (E/N) não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-las. Estas variáveis foram, então, analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

5.9.2 Análise estatística do Experimento 2

As variáveis classificatórias (fatores) utilizadas foram tratamento antioxidante com GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) e tempo de refrigeração (2, 12 e 24 horas). Caso não fosse observada interação entre os dois fatores (tratamento antioxidante e tempo de refrigeração), cada um dos fatores foi analisado isoladamente. Caso contrário, foram levados em conta os 12 tratamentos da interação (4 x 3), utilizando-se o PROC MIXED de medidas repetidas no tempo.

As variáveis resposta porcentagem de células classe I do ensaio cometa (COMETA I) e porcentagem de células classe II do ensaio cometa (COMETA II) obedeceram às premissas não sendo necessárias transformações.

As variáveis resposta porcentagem de células classes III e IV do ensaio cometa (COMETA III e COMETA IV), não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-las. Estas variáveis foram, então, analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

"Se os fatos não se encaixam na teoria, modifique os fatos".

- Albert Einstein

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste experimento foram divididos em: considerações Iniciais, experimento 1, experimento 2 e considerações finais, visando facilitar a discussão e a organização das idéias apresentadas.

6.1 Considerações iniciais

Os ejaculados obtidos variaram de translúcido a leitoso, sendo estes últimos mais densos e mais concentrados. A coloração amarelada expressou contaminação por urina. A contaminação do sêmen por urina em Felídeos é freqüente quando submetidos à eletroejaculação, podendo estar relacionado ao protocolo anestésico utilizado e ao posicionamento da probe (PLATZ; SEAGER, 1978; SWANSON et al., 1996b; TEBET, 2004; ERDMANN, 2005). No presente experimento, o protocolo anestésico foi estipulado pela instituição mantenedora dos animais utilizando-se as drogas disponíveis para tal, e, de certa forma, foi considerado satisfatório.

Inicialmente, os animais eram retirados de seus recintos e alojados em uma caixa de transporte na noite anterior à coleta. Durante as primeiras coletas, foi observado que estes animais, apesar de terem sido submetidos a um período superior 8 horas de jejum hídrico/alimentar, geralmente apresentavam suas vesículas urinárias repletas diante a palpação abdominal realizada durante o exame clínico do animal no início do procedimento de obtenção dos ejaculados. Isto foi associado ao comportamento típico destes felinos de reterem a urina por todo o tempo em que estão nas caixas de transporte. Passou-se, então, a retirar estes animais de seus recintos momentos antes da coleta, o que contribuiu bastante para a diminuição de ejaculados contaminados com urina. Apesar de não ter sido feito nenhum tratamento estatístico para a contaminação dos ejaculados por urina, foi observado que o posicionamento da probe teve maior influência sobre este fator do que o protocolo anestésico utilizado. Ainda assim, vale ressaltar que a variação individual, tanto para a anestesia quanto para o posicionamento ideal da probe, foi considerável.

Invariavelmente, alguns ejaculados assumiam uma coloração rósea depois de incubados por alguns minutos em banho-maria (37°C). Não foi encontrada nenhuma explicação para este fenômeno na literatura, porém Tebet (2004) também descreveu este fato e sugere que isto esteja relacionado ao próprio metabolismo espermático.

Embora a hipótese seja especulativa, seria interessante que fossem desenvolvidos estudos que pudessem esclarecer este fenômeno.

6.2 Experimento 1

Como citado na metodologia da análise estatística, as variáveis resposta foram analisadas primeiramente quanto aos efeitos do diluidor, do tempo de refrigeração e do tratamento com GSH, assim como quanto à interação entre os tratamentos. Caso fosse observada uma interação significativa, a análise era realizada levando-se em conta a combinação entre os tratamentos. Caso contrário, eram analisados apenas os efeitos principais (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores das probabilidades para os efeitos principais dos diluidores TCM, HAM e TGC (DILUIDOR), dos tempos de refrigeração 2, 12 e 24 horas (TEMPO) e do tratamento antioxidante com glutathiona reduzida nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5mM (GSH) e suas interações sobre as variáveis MOTILIDADE, VIGOR, Índice de Motilidade Espermática (IME), porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (E/N), porcentagem de células com acrossomo íntegro (POPE), concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV de amostras espermáticas de gato-domato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	DILUIDOR	GSH	TEMPO	TEMPO X GSH	DILUIDOR X TEMPO X GSH
MOTILIDADE	<0,0001	0,2494	<0,0001	0,9532	0,4336
VIGOR	<0,0001	0,3882	<0,0001	0,9985	0,5606
IME	<0,0001	0,2226	<0,0001	0,9965	0,5326
E/N	<0,0001	0,5951	<0,0001	0,9821	0,3429
POPE	<0,0001	0,7650	<0,0001	0,6468	0,0702
TBARS	0,2039	0,8967	<0,0001	0,9920	0,7054
DAB I	<0,0001	0,4612	<0,0001	0,8559	0,0013
DAB II	0,0159	0,9566	0,5023	0,9794	0,4668
DAB III	<0,0001	0,6980	<0,0001	0,8122	0,3094
DAB IV	0,0309	0,7988	0,0218	0,9425	0,5299

6.2.1 Testes Convencionais

Os testes convencionais para análise de sêmen utilizados no presente experimento foram a porcentagem de células móveis (motilidade), o vigor e o índice de motilidade espermática (IME).

Tabela 2 – Efeito dos diluidores TCM, HAM e TGC (média \pm erro padrão, [IC95%]) sobre a MOTILIDADE, o VIGOR e Índice de Motilidade Espermática (IME) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4 °C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	TCM	HAM	TGC
MOTILIDADE (%)	15,00 \pm 3,41 ^B [7,94; 22,06]	11,57 \pm 2,28 ^B [6,99; 16,16]	62,08 \pm 2,48 ^A [57,04; 67,12]
VIGOR (0-5)	1,56 \pm 0,24 ^B [1,06; 2,07]	1,51 \pm 0,19 ^B [1,13; 1,90]	3,42 \pm 0,10 ^A [3,22; 3,61]
IME	23,12 \pm 3,97 ^B [14,91; 31,34]	20,89 \pm 2,89 ^B [15,07; 26,71]	65,21 \pm 2,14 ^A [60,86; 69,56]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Para as variáveis MOTILIDADE, VIGOR e IME os valores encontrados para o TGC foram maiores que os encontrados para o TCM e HAM (62,08 \pm 2,48, 3,42 \pm 0,10 e 65,21 \pm 2,14; 15,00 \pm 3,41, 1,56 \pm 0,24 e 23,12 \pm 3,97; 11,57 \pm 2,28, 1,51 \pm 0,19 e 20,89 \pm 2,89, respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 2). O diluidor TGC mostrou-se mais eficaz na manutenção da motilidade e vigor espermático, com sua média para o IME com valor intermediário aos apresentados por Tebet (2004); Erdmann (2005) e Swanson et al. (2002) para sêmen "in natura" (79,30; 69,39 e 62,10; respectivamente). Tebet (2004) menciona que o diluidor à base de gema de ovo usado em seu experimento (Tris-gema-DMSO) para criopreservação de sêmen de gato-do-mato-pequeno, apesar de não apresentar diferença estatística significativa em comparação com outro o diluidor usado (MP50)⁹, proporcionou uma queda menor de motilidade em 10 pontos percentuais. Segundo a própria autora, "provavelmente, se o número de animais utilizados no experimento fosse maior ($n=5$), a diferença poderia se configurar significativa".

⁹ Formulação não autorizada pelos inventores.

Pukazhenth et al. (1999), compararam o diluidor de HAM F10 com um diluidor à base de gema de ovo (PDVF)¹⁰ e verificaram que este último apresentou uma maior eficiência na manutenção da motilidade de amostras refrigeradas de gatos domésticos submetidas a um teste de termoresistência lento (0, 60, 180, 360 minutos / 25°C).

O efeito protetor da gema de ovo ocorre através da fração de lipo-proteínas de baixa densidade (LDF), porém, a forma como ocorre esse mecanismo ainda não foi completamente elucidada, sabendo-se apenas que esta proteção se dá na superfície externa da membrana espermática (HERMANSSON; AXNER, 2007).

Tabela 3 – Efeito dos tratamentos antioxidantes (média ± erro padrão, [IC95%]) com diferentes concentrações de glutathiona reduzida adicionadas aos diluidores (GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre a MOTILIDADE (%), o VIGOR (0-5) e Índice de Motilidade Espermática (IME) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	GSH 0mM	GSH 0,5mM	GSH 1,0mM	GSH 1,5mM
MOTILIDADE (%)	32,52 ± 5,53 ^A [21,19; 43,89]	29,24 ± 5,80 ^A [17,32; 41,16]	27,59 ± 5,35 ^A [16,59; 38,59]	27,33 ± 5,20 ^A [16,65; 38,01]
VIGOR (0-5)	2,37 ± 0,28 ^A [1,79; 2,94]	2,17 ± 0,29 ^A [1,57; 2,77]	1,98 ± 0,27 ^A [1,43; 2,53]	2,11 ± 0,25 ^A [1,59; 2,63]
IME	39,96 ± 5,38 ^A [28,89; 51,03]	36,29 ± 5,64 ^A [24,68; 47,89]	33,61 ± 5,17 ^A [22,97; 44,25]	34,77 ± 4,90 ^A [24,71; 44,84]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Como mostrado na tabela 3, as diferentes concentrações de GSH não influenciaram as variáveis motilidade, vigor e IME. Da mesma forma, Munsu et al. (2007) em sêmen bovino refrigerado (4-8°C), por 24 horas, não verificaram efeito de diferentes concentrações de GSH (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0mM) sobre a motilidade espermática. No entanto, após 48 horas, a concentração de 0,5mM de GSH foi mais eficaz para a manutenção da motilidade quando comparada com as outras concentrações.

Trabalhos anteriores com a suplementação de GSH em sêmen de suínos e lagomorfos resfriado por até duas horas, também não verificaram melhora na motilidade das amostras (GADEA et al., 2005; MARCO-JIMENEZ et al., 2006). Por outro lado, Gadea

¹⁰ PDVF: variante do diluente de Platz filtrado (20% de gema de ovo, 11% de lactose) submetido a filtração (0,2-µm).

et al. (2005), verificaram um efeito benéfico do GSH (1,0mM) sobre a motilidade após congelamento/descongelamento das amostras.

Tabela 4 – Efeito do tempo (média \pm erro padrão, [IC95%]; para 2, 12 e 24 HORAS) sobre a MOTILIDADE (%), o VIGOR (0-5) e Índice de Motilidade Espermática (IME) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	2 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
MOTILIDADE (%)	44,78 \pm 4,08 ^A [36,48; 53,07]	27,61 \pm 4,98 ^B [17,51; 37,71]	15,12 \pm 3,61 ^C [7,80; 22,45]
VIGOR (%)	3,11 \pm 0,12 ^A [2,87; 3,35]	2,08 \pm 0,25 ^B [1,58; 2,59]	1,28 \pm 0,21 ^C [0,85; 1,71]
IME	53,50 \pm 3,14 ^A [47,12; 59,88]	34,64 \pm 4,77 ^B [24,96; 44,32]	20,34 \pm 3,78 ^C [12,67; 28,01]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Houve uma influência significativa do tempo sobre as variáveis motilidade, vigor e IME que apresentaram uma queda entre o tempo inicial e final (motilidade = 44,78 \pm 4,08, 27,61 \pm 4,98 e 15,12 \pm 3,61; vigor = 3,11 \pm 0,12, 2,08 \pm 0,25 e 1,28 \pm 0,21; IME = 53,50 \pm 3,14, 34,64 \pm 4,77 e 20,34 \pm 3,78, para 2, 12 e 24 horas respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 4). Esses resultados são condizentes com o experimento de Villaverde et al. (2006) em amostras resfriadas a 5°C, porém os valores apresentados para MOTILIDADE e VIGOR por estes autores, após 24 horas, foi muito superior (76,9 \pm 7,9 e 3,9 \pm 0,4, respectivamente; $p < 0,05$). Isto pode ser explicado diante do fato de que os dados apresentados por aqueles autores são referentes apenas ao efeito do tempo em amostras diluídas em TGC e aqui foi analisado o efeito tempo sem ser levado em consideração o efeito dos diluidores (TCM, HAM e TGC). Além disso, Villaverde et al. (2006) utilizaram sêmen epididimário de gatos domésticos, cujos parâmetros seminais são conhecidamente superiores aos do gato-do-mato-pequeno.

6.2.2 Testes Funcionais

No presente experimento foram utilizados, como testes funcionais de análise de sêmen, as avaliações da integridade da membrana plasmática (E/N), da integridade do acrossomo (POPE) e da atividade mitocondrial (DAB).

Tabela 5 - Efeito dos diluidores TCM, HAM e TGC (média \pm erro padrão, [IC95%]) sobre a porcentagem de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra (E/N) em amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	TCM	HAM	TGC
E/N (%)	37,92 \pm 4,71 ^B [27,54; 48,29]	28,66 \pm 3,79 ^B [21,04; 36,29]	57,58 \pm 1,61 ^A [54,29; 60,87]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

O diluidor TGC mostrou-se mais eficaz em preservar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides neste experimento, visto que apresentou uma porcentagem significativamente menor de células coradas pela eosina/nigrosina (E/N) em relação ao TCM e HAM (57,58 \pm 1,61, 37,92 \pm 4,71 e 28,66 \pm 3,79, respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 5).

Harris et al. (2001), verificaram que a gema de ovo apresentou melhores resultados na manutenção de sêmen de gato doméstico por prolongado período quando comparado com uma solução livre de eletrólitos (0,33M glicose e 3% BSA). Da mesma forma, Tittarelli et al. (2006) compararam a solução salina isotônica (SAL) com um diluidor com gema de ovo (TEY, Tris-citrato, gema de ovo e frutose) para a manutenção de sêmen felino (*F. catus*) no interior do epidídimo a 4°C por 24, 48 e 72 horas. Neste experimento os autores não encontraram diferenças significativas entre os tempos, porém comparando os dois diluidores através do teste hipo-osmótico (HOS), verificaram a superioridade do diluidor à base de gema de ovo para a manutenção da integridade da membrana plasmática em relação à solução salina (SAL = 76,4 \pm 3,6; 8,4 \pm 2,2; 75,1 \pm 3,2 e TEY = 82,1 \pm 1,8; 82,4 \pm 2,4; 79,1 \pm 4,5; para 24, 48 e 72 horas, respectivamente; $p < 0,05$).

Tabela 6 – Efeito dos tratamentos antioxidantes (média \pm erro padrão, [IC95%]) com diferentes concentrações de glutathiona reduzida adicionadas aos diluidores (GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana plasmática íntegra (E/N) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	GSH 0mM	GSH 0,5mM	GSH 1,0mM	GSH 1,5mM
E/N (%)	45,08 \pm 4,81 ^A [35,10; 55,06]	37,96 \pm 5,30 ^A [24,68; 47,89]	38,69 \pm 5,08 ^A [22,97; 44,25]	37,98 \pm 5,29 ^A [24,71; 44,84]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

O tratamento antioxidante, nas concentrações de GSH utilizadas, não influenciou significativamente na integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (Tabela 6).

Em experimento realizado por Gadea et al. (2005), usando sêmen de cachaco tratado com diferentes concentrações de GSH (controle, 1 e 5mM), os autores verificaram que nas amostras tratadas houve uma maior porcentagem de células com membrana íntegra (iodeto de propídeo / citometria de fluxo) pós-descongelamento em relação ao controle (controle = 42,45 \pm 2,00; 1mM = 53,32 \pm 1,87 e 5mM = 51,24 \pm 1,46; $p < 0,05$). No entanto, este mesmo grupo, em experimento anterior (GADEA et al., 2004), verificou a ausência de efeito do GSH na integridade da membrana (eosina/nigrosina – microscopia convencional) de amostras espermáticas de cachacos pós-descongelamento (dados não apresentados). Segundo os autores, vários fatores podem colaborar para os resultados controversos em relação ao tratamento com GSH, sendo um deles a técnica utilizada para a avaliação do sêmen, sendo que técnicas que envolvem microscopia possuem menor acurácia quando comparadas com técnicas mais sensíveis como, por exemplo, a citometria de fluxo.

Tabela 7 – Efeito do tempo (média \pm erro padrão, [IC95%]; para 2, 12 e 24 HORAS) sobre a porcentagem de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra (E/N) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	2 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
E/N (%)	55,95 \pm 3,00 ^A [49,83; 62,07]	37,90 \pm 4,27 ^B [29,13; 46,67]	25,67 \pm 4,07 ^C [17,36; 33,98]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Os tempos 2, 12 e 24 horas diferiram significativamente entre si para a variável resposta E/N, sendo que, quanto maior o tempo maior a perda de integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (55,95 \pm 3,00, 37,90 \pm 4,27 e 25,67 \pm 4,07, para 2, 12 e 24 horas respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 7).

A influência deletéria do tempo na integridade da membrana plasmática de amostras espermáticas resfriadas de felinos, tem sido relatada por diversos autores. Glover e Watson (1987) verificaram que o sêmen do gato doméstico (*F. catus*), coletado por vagina artificial e resfriado (5°C), apresentou um aumento na porcentagem de células coradas pela coloração eosina/nigrosina após 24 horas de resfriamento (16 e 25%). Siemieniuch e Dubiela (2007) encontraram resultados semelhantes para sêmen epididimário resfriado (4°C), também de gatos domésticos, (0 hora = 84,9 \pm 7,8 e 24 horas = 73,7 \pm 7,5% de células com membrana íntegra; eosina/nigrosina). Tittarelli et al. (2006), verificaram, após 24 horas de armazenamento do sêmen de gato doméstico sob refrigeração (4°C), 64,5 \pm 2,8 % de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (eosina/nigrosina). A comparação dos resultados citados com o presente experimento se torna complicada, uma vez que os resultados aqui apresentados são referentes a todos os diluidores (HAM, TCM e TGC) sendo que os valores obtidos com o HAM e TCM foram bastante inferiores aos observados no TGC. Além disso, devemos considerar que os experimentos anteriormente citados foram realizados com sêmen de gato doméstico (*F. catus*), espécie cuja qualidade espermática é conhecidamente superior à de felinos silvestres.

A variável POPE apresentou interação significativa entre os tratamentos (diluidor, tempo e GSH). Portanto, esta variável foi analisada levando-se em conta a combinação entre os tratamentos.

Tabela 8 – Efeito da combinação dos tratamentos Diluidor (TCM, HAM, TGC), Tempo (2, 12 e 24 horas) e GSH (concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5mM de glutatona reduzida no diluidor) sobre a porcentagem (média \pm erro padrão) espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

Diluidor	GSH	Tempo		
		2	12	24
TCM	0	73,50 \pm 3,50 ^A	50,50 \pm 8,50 ^{B,C,D,E,F,G}	20,25 \pm 0,25 ^{K,L}
TCM	0,5	60,00 \pm 1,00 ^{A,B,C,D}	51,00 \pm 0,00 ^{B,C,D,E,F,G}	25,00 \pm 0,00 ^{J,K,L}
TCM	1,0	68,50 \pm 5,50 ^{A,B,C}	54,50 \pm 4,50 ^{A,B,C,D,E,F}	27,50 \pm 2,50 ^{J,K,L}
TCM	1,5	71,75 \pm 0,75 ^{A,B}	62,25 \pm 4,25 ^{A,B,C,D}	46,50 \pm 0,50 ^{D,E,F,G,H,I}
HAM	0	70,13 \pm 8,02 ^{A,B,C}	35,25 \pm 10,28 ^{F,G,H,I,J,K}	17,13 \pm 3,04 ^{K,L}
HAM	0,5	64,13 \pm 9,09 ^{A,B,C,D}	30,88 \pm 7,76 ^{G,H,I,J,K,L}	12,88 \pm 2,48 ^L
HAM	1,0	69,63 \pm 5,84 ^{A,B,C}	28,00 \pm 8,53 ^{H,I,J,K,L}	12,00 \pm 3,25 ^L
HAM	1,5	58,63 \pm 8,75 ^{A,B,C,D,E}	27,75 \pm 8,27 ^{I,J,K,L}	12,00 \pm 5,69 ^L
TGC	0	49,50 \pm 11,50 ^{C,D,E,F,G,H,I}	.	30,50 \pm 3,01 ^{G,H,I,J,K,L}
TGC	0,5	59,75 \pm 11,25 ^{A,B,C,D,E}	45,50 \pm 16,00 ^{D,E,F,G,H,I}	28,33 \pm 3,11 ^{H,I,J,K,L}
TGC	1,0	56,00 \pm 10,50 ^{A,B,C,D,E,F}	38,00 \pm 5,00 ^{E,F,G,H,I,J,K}	28,17 \pm 1,48 ^{H,I,J,K,L}
TGC	1,5	49,75 \pm 12,25 ^{C,D,E,F,G,H}	35,50 \pm 6,00 ^{F,G,H,I,J,K}	30,00 \pm 2,02 ^{G,H,I,J,K,L}

^{A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L}: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

Para a avaliação da integridade acrossomal (variável resposta POPE), não houve diferença em função das concentrações de glutatona para os tempos 2 e 12 horas nas amostras em TCM, porém, após 24 horas, a concentração de 1,5mM de GSH apresentou maior porcentagem de acrossomos íntegros. As diferentes concentrações de GSH no diluidor HAM, não resultaram em diferenças estatísticas que demonstrassem sua capacidade em manter a integridade acrossomal dos espermatozóides resfriados ao longo dos três tempos (2, 12 e 24 horas). O mesmo foi observado no diluidor TGC nos tempos 2 e 24 horas. Nas amostras mantidas por 12 horas, os valores para integridade acrossomal nas amostras diluídas em TGC na concentração de 0,5mM (45,50 \pm 16,00) não diferiu das outras concentrações no mesmo diluidor (Tabela 8).

Para o diluidor TCM, no controle (0mM de GSH), houve uma queda significativa na integridade acrossomal ao longo do temp avaliado (2 horas = 73,50 \pm 3,50, 12 horas = 50,50 \pm 8,50 e 24 horas = 20,25 \pm 0,25; $p < 0,05$; Tabela 8). Neste mesmo diluidor, nas

concentrações 0,5 e 1,0mM de GSH, o tempo 24 horas apresentou uma diminuição significativa da integridade acrossomal em relação aos tempos anteriores (tempo 2 horas = $60,00 \pm 1,00$ e $68,50 \pm 5,50$; tempo 12 horas = $51,00 \pm 0,00$ e $54,50 \pm 4,50$; tempo 24 horas = $25,00 \pm 0,00$ e $27,50 \pm 2,50$, para 0,5 e 1,0mM de GSH respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 8). Na concentração 1,5mM de GSH, no diluidor TCM, foi encontrada uma diferença significativa entre os tempos 2 e 24 horas ($71,75 \pm 0,75$ e $46,50 \pm 0,50$, respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 8).

Em todas as concentrações de GSH utilizadas no diluidor HAM houve diferença significativa entre o tempo 2 horas e os outros tempos, mostrando que houve um decréscimo na porcentagem de acrossomos íntegros do tempo inicial para o final (0mM = $70,13 \pm 8,02$, $35,25 \pm 10,28$, $17,13 \pm 3,04$; 0,5mM = $64,13 \pm 9,09$, $30,88 \pm 7,76$, $12,88 \pm 2,48$; 1,0mM = $69,63 \pm 5,84$, $28,00 \pm 8,53$, $12,00 \pm 3,25$; 1,5mM = $58,63 \pm 8,75$, $27,75 \pm 8,27$, $12,00 \pm 5,69$; para os tempos 2, 12 e 24 horas, respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 8).

Nas concentrações de 0,5 e 1,0mM acrescidas a este mesmo diluidor, houve uma diminuição significativa na porcentagem de espermatozóides com acrossomo íntegro entre os tempos 2 e 24 horas (tempo 2 horas = $64,13 \pm 9,09$ e $69,63 \pm 5,84$; tempo 24 horas = $12,88 \pm 2,48$ e $12,00 \pm 3,25$, para 0,5 e 1,0mM de GSH respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 8).

No tempo 2 horas, para a concentração de 0 e 1,5mM de GSH, o TCM apresentou maior porcentagem de acrossomos íntegros em relação ao TGC (0mM = $73,50 \pm 3,50$ e $49,50 \pm 11,50$; 1,5mM = $71,75 \pm 0,75$ e $49,75 \pm 12,25$, para TCM e TGC respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 8). Estes resultados sugerem que durante as primeiras duas horas, tempo necessário para o resfriamento das amostras de 37°C para 4°C (-0,2°C/min), o diluidor TCM se mostrou mais eficiente para a manutenção da integridade acrossomal dos espermatozóides.

Neste mesmo tempo, na concentração de 1,0mM de GSH, o TCM apresentou maior porcentagem de espermatozóides com acrossomos íntegros em relação ao HAM ($54,50 \pm 4,50$ e $28,00 \pm 8,53$, respectivamente; $p < 0,05$). Avaliando-se apenas a concentração de 1,5mM de GSH, ainda no tempo 12 horas, houve uma maior porcentagem de células com acrossomo íntegro no TCM quando comparado tanto ao HAM quanto ao TGC ($62,25 \pm 4,25$, $27,75 \pm 8,27$ e $35,50 \pm 6,00$, para o TCM, HAM e TGC respectivamente; $p < 0,05$). Da mesma forma, após 24 horas, também na concentração de 1,5mM de GSH, o TCM foi mais eficiente na manutenção da integridade acrossomal em comparação aos outros diluidores ($46,50 \pm 0,50$, $12,00 \pm 5,69$ e $30,00 \pm 2,02$, para TCM, HAM e TGC respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 8).

Os resultados indicam um efeito protetor do GSH na membrana acrossomal apenas para o diluidor TCM. Isto pode ter ocorrido visto que o meio TCM, por si só, foi

extremamente deletério para acrossomo ao longo do tempo, exacerbando o efeito positivo do GSH. Munsil et al. (2007) trataram amostras seminais resfriadas de bovino (5°C) com diferentes concentrações de GSH (0, 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0mM), verificando alterações morfológicas de acrossomo. Neste experimento, os autores verificaram que a concentração de 0,5mM, nas primeiras 24 horas, apresentou menor porcentagem de células com acrossomo danificado quando comparado aos outros grupos. Para os autores este resultado ocorre devido a um aumento da peroxidação lipídica que foi evitado pelo GSH. Pukazhenti et al. (1999) demonstraram que o método de resfriamento rápido do sêmen de gato doméstico, da temperatura ambiente até 5°C, causou um declínio no percentual de espermatozoides com acrossomo intacto de 81,5% (sêmen fresco) para 65,5%, enquanto o método de resfriamento lento reduziu este percentual para 75,5%. Queiroz et al. (2002), relataram que o resfriamento do sêmen de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) a partir da temperatura ambiente para 9°C já é suficiente para causar lesões significativas no acrossomo.

A variável DAB I apresentou interação significativa entre os tratamentos (diluidor, tempo e GSH). Portanto, esta variável foi analisada levando-se em conta a combinação entre os tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9 – Efeito da combinação dos tratamentos Diluidor (TCM, HAM, TGC), Tempo (2, 12 e 24 horas), e GSH (concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5mM de glutathiona reduzida no diluidor) sobre porcentagem (média \pm erro padrão) de espermatozóides classe I para o teste de avaliação da atividade mitocondrial (DAB I) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), refrigeradas a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

Diluidor	GSH	Tempo		
		2	12	24
TCM	0	.	.	.
TCM	0,5	.	.	.
TCM	1,0	.	.	.
TCM	1,5	.	.	.
HAM	0	54,00 \pm 12,14 ^A	24,00 \pm 4,37 ^{C,D,E}	6,50 \pm 1,74 ^{D,E}
HAM	0,5	46,75 \pm 13,98 ^{A,B}	19,75 \pm 7,96 ^{D,E}	3,62 \pm 0,90 ^E
HAM	1,0	51,63 \pm 13,10 ^A	26,25 \pm 11,79 ^{B,C,D}	2,75 \pm 0,83 ^E
HAM	1,5	52,75 \pm 10,27 ^A	5,88 \pm 1,30 ^{D,E}	2,88 \pm 1,01 ^E
TGC	0	56,83 \pm 3,17 ^A	53,75 \pm 4,75 ^A	58,17 \pm 1,01 ^A
TGC	0,5	51,50 \pm 5,20 ^A	56,50 \pm 2,50 ^A	52,17 \pm 2,74 ^A
TGC	1,0	54,50 \pm 2,93 ^A	54,25 \pm 0,25 ^A	49,50 \pm 1,61 ^A
TGC	1,5	54,17 \pm 6,21 ^A	48,00 \pm 8,50 ^{A,B}	46,00 \pm 5,57 ^{A,B,C}

^{A,B,C,D,E}: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

Em todos os tempos, para os espermatozóides classe I na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I), levando-se em consideração o efeito do tratamento antioxidante com a glutathiona (GSH), tanto no diluidor HAM como no TGC, não houve diferenças estatísticas significativas entre as concentrações de GSH utilizadas.

Sob refrigeração no diluidor HAM, as concentrações 0, 0,5 e 1,5mM de GSH resultaram em queda significativa na porcentagem de espermatozóides DAB I do tempo 2 horas para o tempo 12 horas, sendo que, no tempo 24 horas esta queda se manteve. Sob o efeito da concentração de 1,0mM de GSH houve a mesma queda no tempo 12 horas (em relação ao tempo 2 horas), no entanto, observou-se uma diferença significativa entre os tempos 12 e 24 horas. Visto que não houve diferença em função das diferentes concentrações de GSH no tempo 24 horas, pode-se inferir que a concentração de 1,0mM de GSH manteve por mais tempo a atividade mitocondrial dos espermatozóides quando comparada com as outras concentrações utilizadas. Similar aos

resultados encontrados no presente experimento, Gadea et al. (2005) verificaram que o tratamento com 0, 1,0 e 5,0mM de GSH não apresentou efeito significativo na porcentagem de células com mitocôndrias ativas em amostras de sêmen de suíno após refrigeração (5°C) por duas horas ($71,35 \pm 2,43$; $69,28 \pm 4,12$ e $71,92 \pm 4,19\%$; para 0, 1,0 e 5,0mM de GSH, respectivamente). Provavelmente, os valores mais altos encontrados por este autor devem-se à diferente metodologia utilizada (Rodamina 123) que classifica as células em duas categorias (ativa/inativa). Da mesma forma Marco-Jimenez et al. (2006) trabalhando com a suplementação de GSH (0,5mM) em sêmen refrigerado de coelho, por 45 minutos a 5°C, não verificaram diferenças na atividade mitocondrial após a adição do antioxidante.

O diluidor TGC manteve o mesmo nível de atividade mitocondrial até o tempo 24 horas em todas as concentrações de GSH utilizadas. Com o emprego de TGC maior eficiência na manutenção da atividade mitocondrial em relação ao diluidor HAM. Isto pode ser comprovado pela análise do efeito do diluidor nos diferentes tempos e concentrações de GSH.

Inicialmente, pode-se verificar que não houve diferenças entre os diluidores no tempo 2 horas, nas concentrações de GSH utilizadas, o que sugere que mesmo após duas horas não houve efeito dos diluidores ou do tratamento antioxidante. Diante disso, para a atividade mitocondrial, tanto o diluidor HAM como o TGC mostraram-se eficazes para a conservação do sêmen da espécie estudada, sob refrigeração, por até duas horas. No entanto, encontrou-se diferença entre os dois diluidores, tanto no tempo 12 horas como no tempo 24 horas para todas as concentrações de GSH, sendo que o TGC mostrou-se melhor que o HAM. Confirmando os resultados encontrados na análise do efeito dos tempos, pode-se sugerir que o TGC foi melhor que o HAM, para o armazenamento sob refrigeração por 12 ou 24 horas, na manutenção da atividade mitocondrial. Karabinus, Evenson e Kaproth (1991), verificaram que a gema de ovo melhorou a atividade mitocondrial após o descongelamento do sêmen bovino quando comparado com um diluidor sem gema de ovo. Estes autores sugeriram que a gema de ovo confere um efeito protetor que seria perdido durante a diluição do sêmen. De Pauw et al. (2002) também verificaram que um diluidor à base de gema de ovo foi capaz de manter a atividade mitocondrial pós-descongelamento para amostras seminais bovinas obtidas através de vagina artificial e analisadas com o uso de uma sonda fluorescente (JC-1).

Comparando um diluidor à base de gema de ovo com outro apenas com a fração de lipoproteínas (extraída da gema de ovo de avestruz), para o congelamento de sêmen de caçaço, Fraser et al. (2007) não observaram diferenças (dados não apresentados; $p=0,822$) em relação à porcentagem de espermatozóides com mitocôndrias ativas

(Rodamina 123). Estes resultados sugerem que a fração de lipoproteínas da gema de ovo seria responsável pela proteção conferida às mitocôndrias.

A avaliação da atividade mitocondrial não pode ser realizada no diluidor TCM devido a algum problema na diaminobenzidina que estava sendo usada no ensaio. Todos os espermatozóides apresentavam classificação DAB IV, ou seja, com a peça intermediária 100% corada, inclusive os do controle negativo que tiveram suas mitocôndrias inativadas pelo formol. Este problema infelizmente só foi detectado com a leitura das lâminas, que foi realizada após já terem sido processadas todas as amostras de todos os tempos para o diluidor TCM. Imediatamente após ter sido percebido o problema, foi providenciada uma nova diaminobenzidina para a análise dos outros diluidores. Pela escassez de amostra e limitações que impediam a realização de outras coletas, não foi possível repetir a avaliação da atividade mitocondrial para aquele diluidor.

Tabela 10 - Efeito dos diluidores TCM, HAM e TGC sobre a porcentagem (média \pm erro padrão, [IC95%]) de espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	TCM	HAM	TGC
DAB II (%)	.	35,52 \pm 1,91 ^A [31,67; 39,37]	33,76 \pm 0,82 ^A [32,10; 35,44]
DAB III (%)	.	27,44 \pm 2,31 ^A [22,80; 32,08]	8,20 \pm 0,71 ^B [6,75; 9,66]
DAB IV (%)	.	13,05 \pm 2,36 ^A [8,31; 17,79]	4,92 \pm 0,37 ^B [4,17; 5,68]

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Os diluidores HAM e TGC apresentaram diferença significativa sobre a porcentagem de células DAB III e IV. O TGC mostrou-se mais eficaz na manutenção da atividade mitocondrial, visto que, tanto para o DAB III quanto para o DAB IV, apresentou menor porcentagem de células (DAB III = 27,44 \pm 2,31 e 8,20 \pm 0,71; DAB IV = 13,05 \pm 2,36 e 4,92 \pm 0,37, para HAM e TGC respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 10). Corroborando com os resultados descritos e discutidos para a variável DAB I, as variáveis DAB III e DAB IV, que indicam alto grau de comprometimento da atividade mitocondrial dos espermatozóides, apresentaram valores que demonstram menos dano mitocondrial nas amostras refrigeradas com o diluidor à base de gema de ovo.

Tabela 11 – Efeito dos tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutatona reduzida adicionadas aos diluidores (GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre a porcentagem (média \pm erro padrão, [IC95%]) de espermatozoides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	GSH 0mM	GSH 0,5mM	GSH 1,0mM	GSH 1,5mM
DAB II (%)	36,07 \pm 2,43 ^A [30,98; 41,17]	34,20 \pm 2,66 ^A [28,63; 39,77]	34,20 \pm 2,14 ^A [29,72; 38,68]	34,80 \pm 2,45 ^A [29,67; 39,93]
DAB III (%)	17,85 \pm 3,61 ^A [10,30; 25,40]	19,45 \pm 3,42 ^A [12,28; 26,62]	20,55 \pm 3,48 ^A [13,26; 27,84]	21,12 \pm 3,79 ^A [13,19; 29,06]
DAB IV (%)	6,32 \pm 1,02 ^A [4,18; 8,47]	10,52 \pm 3,01 ^A [4,23; 16,82]	10,35 \pm 2,83 ^A [4,42; 16,28]	12,00 \pm 4,20 ^A [3,21; 20,79]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Como pode ser visto na tabela 11, as diferentes concentrações de GSH adicionadas aos diluidores utilizados não apresentaram influência significativa na porcentagem de espermatozoides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial. Este resultado era esperado, visto que o GSH não teve efeito sobre a atividade de células com plena atividade mitocondrial, conforme discutido anteriormente.

Tabela 12 – Efeito do tempo (2, 12 e 24 HORAS) sobre a porcentagem (média \pm erro padrão, [IC95%]) de espermatozoides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	2 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
DAB II (%)	30,64 \pm 1,62 ^B [27,31; 33,97]	41,29 \pm 1,57 ^A [38,03; 44,55]	33,45 \pm 2,33 ^B [28,67; 38,22]
DAB III (%)	11,16 \pm 1,71 ^B [7,65; 14,67]	21,12 \pm 2,92 ^A [15,08; 27,17]	27,14 \pm 3,45 ^A [20,05; 34,24]
DAB IV (%)	5,62 \pm 0,96 ^B [3,66; 7,59]	8,64 \pm 1,54 ^{A,B} [5,45; 11,84]	14,96 \pm 3,75 ^A [7,26; 22,67]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Para a variável DAB II, o tempo 12 horas diferiu significativamente dos outros tempos apresentando maior porcentagem de espermatozoides classe II na avaliação da atividade mitocondrial ($30,64 \pm 1,62$, $41,29 \pm 1,57$ e $33,45 \pm 2,33$, para 2, 12 e 24 horas respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 12).

No tempo 2 horas, a variável DAB III apresentou diferença significativa com maior porcentagem de células do que nos tempos 12 e 24 horas ($11,16 \pm 1,71$, $21,12 \pm 2,92$ e $27,14 \pm 3,45$, para 2, 12 e 24 horas respectivamente; $p < 0,05$). Para a variável DAB IV, o tempo 2 horas diferiu significativamente do tempo 24 horas, quando se obteve uma menor quantidade de células classe IV ($5,62 \pm 0,96$ e $14,96 \pm 3,75$, 2 e 24 horas respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 12).

Gadea et al. (2005), refrigerando sêmen de cachaco por até duas horas a 5°C, não verificaram diferenças em relação à atividade mitocondrial (0 horas = $80,14 \pm 2,65$ e 2 horas = $71,35 \pm 2,43$). Por um período maior de armazenagem sob refrigeração a 4°C, Kasimanickam et al. (2007), trabalhando com sêmen de carneiro, encontraram uma perda significativa da atividade mitocondrial apenas após oito dias (dados apresentados na forma de gráficos). Os resultados obtidos no presente experimento diferem daqueles acima citados, visto que se referem aos dados agrupados de todos os tratamentos e diluidores que, por sua vez, apresentaram discrepâncias entre si.

A detecção de maior porcentagem de células classificadas como DAB II, encontrada no tempo 12 horas, em relação aos tempos 0 e 24 horas, pode ser explicado pela queda da atividade mitocondrial que levaram as células DAB I a serem classificadas como DAB II, do tempo 0 para 12 horas. O mesmo do tempo 12 para 24 horas, de DAB II ou III para DAB III ou IV, respectivamente.

6.2.3 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

Para a avaliação do status oxidativo da célula espermática foi utilizada indução da peroxidação lipídica seguida da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, índice de estresse oxidativo.

Tabela 13 - Efeito dos diluidores TCM, HAM e TGC sobre as concentrações (média \pm erro padrão, [IC95%]) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	TCM	HAM	TGC
TBARS (ng/10 ⁶ sptz)	168,61 \pm 31,69 ^C [103,05; 234,17]	552,20 \pm 78,10 ^B [394,80; 709,60]	1900,19 \pm 341,42 ^A [1207,07; 2593,31]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Quanto à resistência dos espermatozóides à peroxidação lipídica, houve diferença significativa entre os diluidores, sendo que os espermatozóides mantidos no TCM apresentaram maior resistência à peroxidação do que nos outros diluidores (168,61 \pm 31,69, 552,20 \pm 78,10 e 1900,19 \pm 341,42, para TCM, HAM e TGC respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 13).

A maior produção de TBARS pelos espermatozóides mantidos no meio TGC pode ter ocorrido devido à incorporação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) provenientes da gema de ovo na membrana espermática. Provavelmente a lavagem das amostras utilizando PBS não foi suficiente para a completa remoção dos ácidos graxos provenientes da gema de ovo. Sendo assim, os valores elevados de TBARS não indicam necessariamente uma menor resistência dos espermatozóides a este estresse, com o emprego deste diluidor.

A maior produção de TBARS verificada no meio HAM, em relação ao meio TCM, pode ser explicada pela presença de ferro e cobre em sua formulação. De acordo com Agarwal, Saleh e Bedaiwy (2003), a utilização do meio de HAM F10 para biotécnicas aplicadas ao sêmen pode promover uma maior produção de ROS. Isto ocorre através da reação de Fenton, na qual íons de cobre e ferro participariam na formação do radical hidroxila, a partir do peróxido de hidrogênio (NORDEBERG; ARNÉR, 2001).

Tabela 14 – Efeito dos tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutathiona reduzida adicionadas aos diluidores (GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre as concentrações (média \pm erro padrão, [IC95%]) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	GSH 0mM	GSH 0,5mM	GSH 1,0mM	GSH 1,5mM
TBARS (ng/10 ⁶ sptz)	997,9 \pm 421,6 ^A [129,67; 1866,20]	950,0 \pm 240,5 ^A [454,70; 1445,41]	804,5 \pm 150,3 ^A [495,52; 1113,45]	959,0 \pm 260,7 ^A [422,15; 1495,85]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Não houve diferença em respostas às diferentes concentrações de GSH adicionadas aos diluidores sobre a resistência dos espermatozoides à peroxidação lipídica (997,9 \pm 421,6, 950,0 \pm 240,5 e 959,0 \pm 260,7, para 0, 0,5, 1,0 e 1,5mM de GSH respectivamente; $p > 0,05$; Tabela 14).

Apesar de não significativa, as amostras tratadas com 1,0mM de GSH apresentaram um valor médio inferior ao controle de aproximadamente 20%. Provavelmente com um maior número de repetições essa diferença poderia mostrar-se significativa. Essa ausência de diferenças também poderia ser explicada pela ineficiência do GSH caso a ROS responsável pelo estresse oxidativo, causado durante o resfriamento, fosse o ânion superóxido. O principal mecanismo de ação antioxidante da GSH é dependente da glutathiona peroxidase (GPx), no qual o GSH participa como co-substrato na metabolização do H₂O₂, em reação catalisada pela GPx, com a produção de H₂O e glutathiona oxidada (GSSG), que pode ser reduzida novamente em GSH pela glutathiona redutase que a utiliza para metabolizar o H₂O₂ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Sendo assim, caso não haja a presença de GPx, ou mesmo que haja sua presença, porém o H₂O₂ não seja a ROS responsável pelos danos, o GSH não será eficaz.

Tabela 15 – Efeito do tempo (2, 12 e 24 HORAS) sobre as concentrações (média \pm erro padrão, [IC95%]) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	2 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
TBARS (ng/10 ⁶ sptz)	820,18 \pm 174,47 ^A [464,80; 1175,55]	778,11 \pm 214,89 ^A [341,87; 1214,35]	1172,91 \pm 308,67 ^A [546,27; 1799,55]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Não houve diferença na resistência das células à peroxidação lipídica em função dos tempos 2, 12 e 24 horas ($820,18 \pm 174,47$, $778,11 \pm 214,89$ e $1172,91 \pm 308,67$, respectivamente; $p > 0,05$; Tabela 15). Nair et al. (2006) mantiveram sêmen de bovinos e bubalinos sob refrigeração (4-8°C) e verificaram que, ao longo do tempo, estas espécies comportaram-se de maneira distinta. Enquanto que os bubalinos apresentaram um aumento significativo nos níveis de malondialdeído (MDA), entre os tempos 0, 12 e 24 horas ($1,99 \pm 0,26$; $4,62 \pm 0,07$ e $7,12 \pm 0,12$, respectivamente; $p < 0,05$), para os bovinos não foi possível verificar diferenças nos mesmo tempos ($1,17 \pm 0,29$; $2,50 \pm 0,28$ e $4,33 \pm 0,56$, respectivamente; $p > 0,05$). Para estes autores, essas diferenças podem ter ocorrido por variações interespecíficas no perfil lipídico da membrana espermática; os bubalinos possivelmente apresentando uma maior quantidade de PUFA, sendo, conseqüentemente, mais susceptíveis aos ataques das ROS. Isto torna difícil a comparação deste experimento com trabalhos anteriores, uma vez que não foram encontrados, na literatura consultada, estudos em felinos.

6.2.4 Correlações

As correlações entre as variáveis resposta serão avaliadas para cada um dos diluidores separadamente.

6.2.4.1 Diluidor TCM

Os resultados apresentados na tabela 16 referem-se às correlações encontradas entre as variáveis resposta apenas das amostras refrigeradas utilizando o diluidor TCM.

Tabela 16 – Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), células classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), células com membrana plasmática íntegra (E/N), células com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT), Vigor (VIG), Índice de Motilidade Espermática (IME), de amostras espermáticas de gato-domato-pequeno (*L. tigrinus*), coletadas através de eletroejaculação e mantidas sob refrigeração a 4°C, por 2, 12 e 24 horas, no diluidor TCM com diferentes concentrações de GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	E/N	POPE	MOT	VIG	IME
TBARS	-0,06 (0,85)	0,22 (0,30)	-0,12 (0,59)	-0,22 (0,30)	-0,16 (0,44)
DABI
DABI
DABIII
DABIV
E/N	1,0	0,74 (0,005)	0,74 (0,006)	0,78 (0,003)	0,77 (0,003)
POPE	1,0	0,65 (0,0006)	0,59 (0,003)	0,63 (0,001)
MOT	1,0	0,95 (<0,0001)	0,99 (<0,0001)
VIG	1,0	0,98 (<0,0001)

Para a variável resposta E/N, observou-se uma correlação positiva com as variáveis POPE ($r=0,74$; $p=0,005$), MOT ($r=0,74$; $p=0,006$) e IME ($r=0,77$; $p=0,003$), que mostra que quanto maior a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, maior a porcentagem das variáveis POPE, VIG e IME (Tabela 16).

Para a variável POPE, houve uma correlação positiva com as variáveis MOT ($r=0,65$; $p=0,0006$), VIG ($r=0,59$; $p=0,003$) e IME ($r=0,63$; $p=0,001$), indicando que quanto maior a porcentagem de acrossomos íntegros, maior a motilidade, vigor e IME das amostras (Tabela 16).

As correlações encontradas indicam uma forte relação entre a integridade de membrana, a integridade acrossomal e as variáveis relacionadas à mobilidade do espermatozóide. Isto não indica que estas variáveis sejam necessariamente dependentes uma da outra. Visto que o TCM foi visivelmente deletério a todas as funções, esta correlação matemática pode ter sido induzida pelo próprio diluidor. Segundo estudo de Baumber et al. (2000) em sêmen de eqüinos, uma diminuição na motilidade pós-descongelamento pode ocorrer sem alterações detectáveis na viabilidade e integridade acrossomal. Fernández-Santos et al. (2006) verificaram o efeito da gema de ovo e de taxas de refrigeração sobre o IME, mas não sobre a vitalidade e integridade acrossomal

em amostras de sêmen de cervídeo (*Cervus elaphus hispanicus*). Comparando amostras coletadas de epidídimos de gatos domésticos, estocadas em solução à base de gema de ovo ou solução salina, Tittarelli et al. (2006) verificaram que esta última apresentou melhores resultados em relação para motilidade e integridade de membrana (teste hiposmótico). No entanto, neste mesmo experimento, a solução de estocagem não teve efeito na integridade acrossomal.

Pelos motivos já mencionados anteriormente, não foi possível analisar as correlações entre as variáveis DAB I, II, III, IV e as outras variáveis resposta para o diluidor TCM.

6.2.4.2 Diluidor HAM

Os valores apresentados na tabela 17 referem-se às correlações encontradas entre as variáveis resposta das amostras diluídas e refrigeradas no diluidor HAM.

Tabela 17 – Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT), Vigor (VIG), Índice de Motilidade Espermática (IME), de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) mantidos em cativeiro, coletadas através de eletroejaculação e armazenadas sob refrigeração a 4°C, por 2, 12 e 24 horas, no diluidor HAM com diferentes concentrações de GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	E/N	POPE	MOT	VIG	IME
TBARS	-0,23 (0,13)	-0,39 (0,007)	0,02 (0,91)	0,24 (0,11)	-0,15 (0,32)	-0,14 (0,35)	-0,09 (0,54)	-0,15 (0,33)	-0,12 (0,42)
DAB I	1,0	-0,08 (0,61)	-0,78 ($<0,0001$)	-0,70 ($<0,0001$)	0,73 ($<0,0001$)	0,75 ($<0,0001$)	0,63 ($<0,0001$)	0,54 ($<0,0001$)	0,59 ($<0,0001$)
DAB II	.	1,0	0,24 (0,10)	-0,29 (0,04)	-0,15 (0,32)	-0,07 (0,70)	-0,12 (0,43)	-0,08 (0,60)	-0,09 (0,53)
DAB III	.	.	1,0	0,056 ($<0,0001$)	-0,62 ($<0,0001$)	-0,73 ($<0,0001$)	-0,58 ($<0,0001$)	-0,48 (0,0006)	-0,54 ($<0,0001$)
DAB IV	.	.	.	1,0	-0,57 ($<0,0001$)	-0,58 ($<0,0001$)	-0,41 (0,004)	-0,29 (0,045)	-0,37 (0,0093)
E/N	1,0	0,81 ($<0,0001$)	0,88 ($<0,0001$)	0,81 ($<0,0001$)	0,86 ($<0,0001$)
POPE	1,0	0,86 ($<0,0001$)	0,81 ($<0,0001$)	0,85 ($<0,0001$)
MOT	1,0	0,95 ($<0,0001$)	0,99 ($<0,0001$)
VIG	1,0	0,98 ($<0,0001$)

Para as variáveis E/N e POPE, foram observadas fortes correlações positivas entre elas ($r=0,81$; $p<0,0001$) e com as variáveis MOT e VIG (MOT: $r=0,88$; $p<0,0001$ e $r=0,86$; $p<0,0001$; VIG: $r=0,81$; $p<0,0001$ e $r=0,81$; $p<0,0001$; para E/N e POPE, respectivamente; Tabela 17), indicando que quanto mais houver espermatozóides com a membrana plasmática íntegra, maior a quantidade de células com acrossomos íntegros, assim como, maior será a motilidade e vigor das amostras.

A concentração de TBARS correlacionou-se negativamente com a variável DAB II ($r=-0,39$; $p=0,007$), mostrando que quanto mais TBARS, menor a porcentagem de células DAB II. Espermatozóides classe II na coloração DAB representam células com pouco comprometimento da atividade mitocondrial. No presente experimento, a variável DAB I apresentou, em relação ao TBARS, uma correlação de -0,23, o que no entanto não foi significativa ($p=0,13$; Tabela 17). Sendo assim, provavelmente, se fosse levada em consideração a somatória dessas duas classes, a correlação poderia ser significativa, indicando que quanto maior o grau de integridade das mitocôndrias menor a susceptibilidade ao estresse oxidativo. Além disto, esta ausência de correlação do TBARS,

tanto com o DAB como com outras variáveis, pode ter ocorrido pela presença de íons de ferro e cobre na composição do diluidor HAM, visto que a produção de ROS seria extracelular ao invés de mitocondrial.

As variáveis DAB I e DAB IV mostraram correlação com as variáveis E/N ($r=0,73$; $p<0,0001$ e $r=-0,57$; $p<0,0001$, respectivamente), POPE ($r=0,75$; $p<0,0001$ e $r=-0,58$; $p<0,0001$, respectivamente), MOT ($r=0,63$; $p<0,0001$ e $r=-0,41$; $p=0,004$, respectivamente), VIG ($r=0,54$; $p<0,0001$ e $r=-0,29$; $p=0,045$, respectivamente) e IME ($r=0,59$; $p<0,0001$ e $r=-0,37$; $p=0,0093$), o que significa que quanto maior a porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial, maior a porcentagem de células com membrana plasmática e acrossomos íntegros, maior a motilidade, vigor e, inversamente, quanto maior a porcentagem de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial, menor as porcentagens para aquelas variáveis (E/N, POPE, MOT e VIG; Tabela 17). Corroborando com estes resultados, Wang et al. (2003) demonstraram, em seus experimentos com sêmen humano, uma correlação negativa entre o potencial da membrana mitocondrial e a produção espermática de ROS ($r=0.45$, $p<0,05$). A presença de pequenas quantidades de ROS no plasma seminal sugere que a mitocôndria é a maior fonte de ROS no espermatozoide de homens inférteis (SHARMA; AGARWAL, 1996).

Com a perda da integridade mitocondrial, agentes pró-oxidantes são liberados promovendo uma série de eventos que, em cadeia, atacam outras membranas celulares, dentre elas, as membranas acrossomal e plasmática. Conseqüentemente, estes eventos seriam responsáveis pela queda da motilidade e vigor (AITKEN; BERKER, 2002).

6.2.4.3 Diluidor TGC

Os valores apresentados na tabela 18 referem-se às correlações encontradas entre as variáveis resposta das amostras diluídas e refrigeradas no diluidor TGC.

Tabela 18 – Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT), Vigor (VIG), Índice de Motilidade Espermática (IME), de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) mantidos em cativeiro, coletadas através de eletroejaculação e armazenadas sob refrigeração a 4°C, por 2, 12 e 24 horas, no diluidor TGC com diferentes concentrações de GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	DABI	DABII	DABIII	DABIV	E/N	POPE	MOT	VIG	IME
TBARS	-0,56 (0,0008)	0,16 (0,39)	0,52 (0,002)	0,36 (0,04)	-0,29 (0,10)	-0,52 (0,004)	-0,11 (0,51)	-0,21 (0,22)	-0,17 (0,32)
DABI	1,0	-0,69 (<0,0001)	-0,63 (<0,0001)	-0,40 (0,2)	0,25 (0,17)	0,48 (0,009)	0,26 (0,15)	0,36 (0,04)	0,33 (0,07)
DABII	.	1,0	-0,007 (0,97)	-0,15 (0,40)	0,09 (0,61)	-0,16 (0,40)	-0,08 (0,68)	-0,17 (0,34)	-0,15 (0,41)
DABIII	.	.	1,0	0,30 (0,09)	-0,29 (0,11)	-0,51 (0,006)	-0,32 (0,07)	-0,33 (0,06)	-0,34 (0,05)
DABIV	.	.	.	1,0	-0,27 (0,14)	-0,23 (0,23)	-0,28 (0,11)	-0,31 (0,08)	-0,30 (0,10)
E/N	1,0	0,70 (<0,0001)	0,56 (0,0008)	0,44 (0,01)	0,52 (0,002)
POPE	1,0	0,64 (0,0003)	0,72 (<0,0001)	0,67 (<0,0001)
MOT	1,0	0,86 (<0,0001)	0,96 (<0,0001)
VIGOR	1,0	0,94 (<0,0001)

Foi encontrada uma correlação positiva entre a integridade de membrana plasmática (E/N) e a integridade acrossomal ($r=0,70$; $p<0,0001$), e dessas variáveis com a motilidade e vigor ($r=0,56$; $p=0,0008$ e $r=0,64$; $p=0,0003$; $r=0,44$; $p=0,01$ e $r=0,72$; $p<0,0001$, para E/N e POPE, respectivamente), significando que quanto mais espermatozóides com a membrana plasmática íntegra, maior a quantidade de acrossomos íntegros (Tabela 18).

A variável TBARS correlacionou-se negativamente com DAB I ($r=-0,56$; $p=0,0008$), e positivamente com DAB IV ($r=0,36$; $p=0,04$), demonstrando que quanto maior a quantidade de células com alta atividade mitocondrial, menor a concentração de TBARS. Porém, quanto maior a porcentagem de células com baixa atividade mitocondrial, maior a concentração de TBARS. Foi também encontrada uma correlação negativa entre as variáveis POPE e TBARS ($r=-0,52$; $p=0,004$), mostrando que quanto menor a porcentagem de células com acrossomo íntegro, maior a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Tabela 18).

A porcentagem de células com plena atividade mitocondrial (DAB I) correlacionou-se positivamente com as variáveis POPE e VIG ($r=0,48$; $p=0,009$ e $r=0,36$; $p=0,04$,

respectivamente), o que significa que quanto maior a porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial, maior o vigor e a quantidade de células com acrossomo íntegro. Inversamente, o DAB IV apresentou correlação negativa com POPE ($r=-0,51$; $p=0,0006$), indicando que quanto maior a quantidade de células DAB IV, menor a quantidade de acrossomos íntegros (Tabela 18).

As expressivas correlações encontradas entre TBARS e as variáveis DAB I, DAB IV e POPE, podem ser resultado de um efeito causado pela presença da gema de ovo no diluidor. Provavelmente, com a incorporação de PUFA pela membrana espermática, esta passou a ser mais susceptível ao ataque das ROS. Como resultado da peroxidação de lipídeos (PUFAS) formam-se aldeídos, como o 4-hidroxinonenal e o MDA, conhecidamente citotóxicos (SANOCKA; KURPISZ, 2004). Assim, os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo são potencializados, refletindo-se na integridade da membrana plasmática, acrossomal e, conseqüentemente, da motilidade e vigor.

6.3 Experimento 2

No experimento 2 foi considerado apenas o diluidor TGC que apresentou os melhores resultados para as variáveis avaliadas no experimento 1. Para a avaliação do grau de fragmentação do DNA espermático, foram utilizadas as amostras processadas e armazenadas durante o experimento 1 para aquele diluidor.

Tabela 19 – Valores das probabilidades para os efeitos principais dos tempos de refrigeração 2, 12 e 24 horas (TEMPO) e do tratamento antioxidante com glutathiona reduzida nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5mM (GSH), e suas interações sobre as variáveis: Motilidade; Vigor; Índice de Motilidade Espermática (IME); espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE); concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV); e espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C no diluidor TGC e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	GSH	TEMPO	TEMPO X GSH
MOTILIDADE	<0,0001	0,097	0,9416
VIGOR	<0,0001	0,0139	0,4753
IME	<0,0001	0,0153	0,7983
E/N	0,1601	0,9032	0,9837
POPE	0,0003	0,4229	0,3551
TBARS	0,6155	0,7516	0,8271
DAB I	0,6188	0,3099	0,7561
DAB II	0,5198	0,3408	0,6986
DAB III	0,6255	0,7107	0,8732
DAB IV	0,5304	0,8899	0,9829
COMETA I	0,5658	0,7778	0,8140
COMETA II	0,61490	0,8368	0,9340
COMETA III	0,1490	0,3947	0,6990
COMETA IV	0,6651	0,5999	0,4011

Visto que não foi observada interação entre o tratamento com GSH e os tempos para nenhuma variável (Tabela 19), estas foram analisadas levando-se em conta os efeitos principais dos respectivos tratamentos (Tabelas 20, 21, 22 e 23).

6.3.1 Efeito do tratamento antioxidante

Neste experimento o efeito do tratamento antioxidante foi analisado através dos mesmos testes convencionais e funcionais utilizados no experimento 1 (Tabela 20),

acrescidos do teste Cometa para a avaliação da integridade do DNA espermático (Tabela 21).

Tabela 20 – Efeito dos tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutathiona reduzida adicionadas aos diluidores (média \pm erro padrão, [IC95%]; para GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre a Motilidade; Vigor; Índice de Motilidade Espermática (IME); espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE); concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C no diluidor TGC e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	GSH 0mM	GSH 0,5mM	GSH 1,0mM	GSH 1,5mM
MOTILIDADE (%)	66,11 \pm 4,55 [55,62; 76,60]	65,00 \pm 4,86 [53,79; 76,21]	60,00 \pm 5,46 [47,40; 72,60]	57,22 \pm 5,21 [45,20; 69,24]
VIGOR (%)	3,61 \pm 0,16 [3,24; 3,98]	3,61 \pm 0,20 [3,15; 4,07]	3,22 \pm 0,22 [2,70; 3,73]	3,22 \pm 0,17 [2,83; 3,61]
IME (%)	69,17 \pm 3,73 [60,57; 77,76]	68,61 \pm 4,35 [58,57; 78,65]	62,22 \pm 4,88 [50,96; 73,49]	60,83 \pm 4,08 [51,42; 70,25]
E/N (%)	58,25 \pm 3,58 [49,78; 66,72]	55,69 \pm 3,34 [47,67; 63,70]	57,50 \pm 3,46 [49,31; 65,69]	58,87 \pm 3,00 [51,77; 65,98]
POPE (%)	45,21 \pm 6,25 [29,91; 60,51]	42,21 \pm 6,97 [25,17; 59,26]	38,93 \pm 5,38 [25,76; 52,09]	37,21 \pm 4,56 [26,06; 48,37]
TBARS (ng/10 ⁶ sptz)	2258,58 \pm 1124,91 [-335,46; 852,62]	2145,34 \pm 472,06 [1056,77; 3233,91]	1335,07 \pm 337,32 [557,21; 2112,93]	1861,77 \pm 611,75 [451,06; 3272,48]
DAB I (%)	56,56 \pm 1,55 ^A [52,89; 60,24]	53,00 \pm 2,12 ^{A,B} [47,97; 58,03]	52,56 \pm 1,41 ^{A,B} [49,22; 55,91]	49,56 \pm 3,45 ^B [41,39; 57,73]
DAB II (%)	31,56 \pm 1,40 ^A [28,25; 34,88]	33,00 \pm 1,08 ^{A,B} [30,43; 35,57]	34,19 \pm 0,77 ^{A,B} [32,36; 36,02]	36,31 \pm 2,53 ^B [30,33; 42,30]
DAB III (%)	6,81 \pm 1,00 [4,43; 9,20]	9,31 \pm 1,66 [5,38; 13,27]	7,75 \pm 0,99 [5,42; 10,08]	8,94 \pm 1,92 [4,39; 13,48]
DAB IV (%)	5,06 \pm 0,64 [3,56; 6,57]	4,43 \pm 0,58 [3,05; 5,82]	4,87 \pm 0,84 [2,88; 6,87]	5,31 \pm 0,95 [3,06; 7,57]

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas, a ausência de letras indica que não houve diferença significativa (p<0,05). IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

As únicas variáveis influenciadas pelo tratamento com GSH foram o DAB I e II, sendo que a variável DAB I apresentou uma diminuição na comparação entre os tempos 0 e 24 horas ($56,56 \pm 1,55$ e $49,56 \pm 3,45$; $p < 0,05$, respectivamente), e, inversamente, a variável DAB II apresentou um aumento nestes mesmos tempos ($31,56 \pm 1,40$ e $36,31 \pm 2,53$; $p < 0,05$, respectivamente; Tabela 20). O antioxidante mais importante para a proteção mitocondrial é o GSH e o sistema GPx (ORRENIUS, 2007). O fato do tratamento antioxidante com GSH utilizado no presente experimento não ter apresentado o efeito esperado para a atividade mitocondrial, pode ter ocorrido, como discutido anteriormente, por uma quantidade insuficiente de GPx, pelo fato do H_2O_2 não ter sido a principal ROS causadora dos danos ocorridos, além de um aumento da susceptibilidade das células ao estresse oxidativo causado pela incorporação de PUFA's, provenientes na gema de ovo, pelas membranas espermáticas.

Tabela 21 - Efeito dos tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutatona reduzida adicionadas aos diluidores (média \pm erro padrão, [IC95%]; para GSH 0mM, GSH 0,5mM, GSH 1,0mM, GSH 1,5mM) sobre a porcentagem (média \pm erro padrão) de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C no diluidor TGC e coletadas através de eletroejaculação - Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo - 2006-2007

	GSH 0mM	GSH 0,5mM	GSH 1,0mM	GSH 1,5mM
Cometa I (%)	$60,44 \pm 6,29$ [45,93; 74,96]	$59,00 \pm 5,87$ [45,45; 72,55]	$52,89 \pm 6,25$ [38,47; 67,31]	$53,00 \pm 6,06$ [39,03; 66,97]
Cometa II (%)	$31,39 \pm 5,43$ [18,86; 43,91]	$35,28 \pm 5,09$ [23,54; 47,02]	$38,33 \pm 4,50$ [27,95; 48,71]	$35,72 \pm 4,59$ [25,13; 46,32]
Cometa III (%)	$7,50 \pm 1,71$ [3,56; 11,44]	$5,55 \pm 1,31$ [2,54; 8,57]	$8,22 \pm 2,33$ [2,85; 13,59]	$10,83 \pm 2,88$ [4,18; 17,49]
Cometa IV (%)	$0,67 \pm 0,22$ [0,16; 1,18]	$0,17 \pm 0,08$ [-0,03; 0,36]	$0,55 \pm 0,44$ [-0,45; 1,56]	$0,44 \pm 0,19$ [-0,01; 0,89]

A ausência de letras indica que não houve diferença significativa ($p < 0,05$).
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

As diferentes concentrações de GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) não mostraram efeito sobre as amostras diluídas em TGC e avaliadas quanto ao grau de fragmentação de DNA. Baumber et al. (2003) submeteram amostras espermáticas de eqüinos a um desafio com o sistema gerador de ROS xantina/xantina-oxidase responsável pela produção de O_2^- e, principalmente, H_2O_2 . Neste experimento, as amostras foram tratadas com catalase, superóxido dismutase e GSH. Os autores verificaram, através do ensaio de cometa, que

apenas a catalase e o GSH foram capazes de diminuir a fragmentação de DNA em relação ao controle e às amostras tratadas com superóxido dismutase. Visto que a catalase, mas não a SOD, se mostrou eficaz em proteger o DNA espermático, pode-se inferir que a ROS responsável pelos danos oxidativos foi o H_2O_2 . Diante destas evidências, pode-se verificar a eficácia do GSH na remoção do H_2O_2 . Em experimento Donnely, Mc Clure e Lewis (2003) trataram amostras seminais humanas incubadas por 4 horas com GSH concomitante à indução da peroxidação com H_2O_2 e observaram que este antioxidante foi capaz de diminuir a fragmentação do DNA espermático. Porém, ao tratar as amostras sem a presença do H_2O_2 os danos ao DNA durante o período de incubação das amostras não foram evitados. Estes estudos, aliados aos resultados obtidos no presente experimento, reafirmam a hipótese de que o H_2O_2 não foi a ROS responsável pelo aumento do estresse oxidativo observado nas amostras seminais de gato-do-mato-pequeno mantidas em TGC.

6.3.2 Efeito do tempo

O efeito do tempo de refrigeração das amostras espermáticas foi analisado através dos mesmos testes convencionais e funcionais utilizados no experimento 1 (Tabela 22), acrescidos do teste Cometa para a avaliação da integridade do DNA espermático (Tabela 23).

Tabela 22 – Efeito do tempo (média \pm erro padrão, [IC95%]; para 2, 12 e 24 HORAS) sobre a Motilidade; Vigor; Índice de Motilidade Espermática (IME); espermatozoides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozoides com acrossomo íntegro (POPE); concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); espermatozoides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB II, DAB III e DAB IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C no diluidor TGC e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	2 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
MOTILIDADE (%)	74,16 \pm 2,20 ^A [69,31; 79,01]	67,50 \pm 2,09 ^B [62,90; 72,09]	44,58 \pm 2,42 ^C [39,26; 49,91]
VIGOR (%)	3,83 \pm 0,11 ^A [3,59; 4,08]	3,62 \pm 0,13 ^A [3,35; 3,90]	2,79 \pm 0,07 ^B [2,63; 2,96]
IME (%)	75,42 \pm 2,15 ^A [70,68; 80,15]	70,00 \pm 2,02 ^A [65,56; 74,44]	50,21 \pm 1,75 ^B [46,35; 54,07]
E/N (%)	59,87 \pm 3,30 ^{A,B} [52,62; 67,13]	61,00 \pm 1,40 ^A [57,69; 64,31]	53,00 \pm 2,19 ^B [48,19; 57,81]
POPE (%)	53,75 \pm 4,61 ^A [42,86; 64,64]	45,50 \pm 5,28 ^A [33,00; 58,00]	29,25 \pm 1,11 ^B [26,81; 31,69]
TBARS (ng/10 ⁶ sptz)	1596,04 \pm 377,46 [765,27; 2426,82]	1746,68 \pm 534,80 [569,59; 2923,77]	2357,84 \pm 809,09 [577,05; 4138,64]
DAB I (%)	55,25 \pm 2,04 [49,77; 58,73]	53,12 \pm 2,24 [47,83; 58,42]	51,46 \pm 1,93 [47,22; 55,70]
DAB II (%)	32,58 \pm 1,61 [29,03; 36,13]	35,00 \pm 1,16 [32,25; 37,75]	34,12 \pm 1,28 [31,32; 36,93]
DAB III (%)	7,62 \pm 1,25 [4,88; 10,37]	7,56 \pm 1,08 [5,01; 10,11]	9,21 \pm 1,27 [6,41; 12,01]
DAB IV (%)	5,46 \pm 0,83 [3,63; 7,29]	4,19 \pm 0,34 [3,38; 5,00]	4,87 \pm 0,48 [3,82; 5,93]

^{A,B,C}: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas, a ausência de letras indica que não houve diferença significativa ($p < 0,05$). IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

A motilidade foi a variável mais influenciada pelo tempo nas amostras refrigeradas no diluidor TGC, sendo que houve diferença entre todos os tempos estudados (2 horas = 74,16 \pm 2,20, 12 horas = 67,50 \pm 2,09 e 24 horas = 44,58 \pm 2,42, $p < 0,05$; Tabela 22).

Tanto o vigor, como o índice de motilidade espermática, apresentaram uma queda significativa apenas após 24 horas de refrigeração (2 horas = 3,83 \pm 0,11 e 75,42 \pm 2,15; 24 horas = 2,79 \pm 0,07 e 50,21 \pm 1,75; para VIG e IME, respectivamente; Tabela 22).

O tempo teve efeito semelhante sobre a variável POPE, mostrando um declínio na porcentagem de células com acrossomo íntegro apenas após 24 horas sob refrigeração ($53,75 \pm 4,61$ e $29,25 \pm 1,11$; para 2 e 24 horas, respectivamente; Tabela 22).

Para a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, foi encontrada diferença apenas entre os tempos 12 e 24 horas ($61,00 \pm 1,40$ e $53,00 \pm 2,19$, respectivamente; $p < 0,05$; Tabela 22).

Os resultados obtidos indicam que as variáveis MOT, VIG, E/N e POPE apesar de apresentarem diferenças estatísticas entre o tempo 0 e 24 horas, mostraram uma resposta heterogênea ao longo dos tempos. Analisando sêmen de cervídeo refrigerado (4°C), Hishinuma, Suzuki e Sekine (2003), obtiveram resultados similares para motilidade, integridade de membrana plasmática e acrossomal. Neste experimento, os autores verificaram que a motilidade foi mais sensível ao efeito do tempo, verificando diferenças entre 0 e 24 horas as quais não foram observadas para a integridade acrossomal. Já para Tittarelli et al. (2006), o efeito do tempo sobre essas mesmas variáveis (MOT, E/N e POPE) causou uma diferença significativa levando a uma diminuição de seus valores ao longo do tempo. Os diferentes resultados encontrados para motilidade, integridade da membrana plasmática e acrossomal indicam que o efeito benéfico da gema de ovo na motilidade é causado por outro mecanismo que não a manutenção da viabilidade, e que a membrana plasmática pode reagir de maneira diferente em comparação à acrossomal submetidas ao mesmo tratamento (HERMANSSON; AXNÉR, 2007).

Tabela 23 – Efeito do tempo (2, 12 e 24 HORAS) sobre a porcentagem (média \pm erro padrão, [IC95%]) de espermatozoides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV) de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C no diluidor TGC e coletadas através de eletroejaculação – Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo – 2006-2007

	2 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
Cometa I (%)	55,00 \pm 2,69 [49,08; 60,92]	61,17 \pm 5,83 [48,34; 74,00]	52,83 \pm 6,35 [38,85; 66,82]
Cometa II (%)	33,71 \pm 2,55 [28,10; 39,31]	32,92 \pm 4,65 [22,69; 43,14]	38,92 \pm 4,94 [28,03; 49,80]
Cometa III (%)	10,87 \pm 2,07 ^A [6,32; 15,43]	5,58 \pm 1,54 ^B [2,19; 8,97]	7,62 \pm 1,75 ^{AB} [3,77; 11,48]
Cometa IV (%)	0,42 \pm 0,13 [0,12; 0,71]	0,33 \pm 0,14 [0,02; 0,65]	0,62 \pm 0,35 [-0,14; 1,39]

^{A,B,C}: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média

Linfor e Meyers (2002) em experimento com sêmen de equino, mantidos a 5°C, verificaram que após 24 horas não houve aumento na taxa de fragmentação de DNA das amostras avaliadas pelo ensaio de cometa (dados apresentados graficamente). Neste estudo, os autores classificaram as células em fragmentadas ou não.

Zini et al. (1999) avaliou a motilidade e a integridade do DNA (SCSA) de amostras espermáticas humanas submetidas a duas técnicas de gradiente de Percoll (2 e 4 camadas). Os autores verificaram que ambos os gradientes de Percoll foram benéficos para a motilidade, porém aumentaram a desnaturação do DNA espermático.

Soler et al. (2005) estocaram epidídimos de cervídeos a 5°C e verificaram que, por até 24 horas, não houve influência do tempo sobre a integridade do DNA (SCSA) espermático.

6.3.3 Correlações

As correlações apresentadas na tabela 24 são referentes às encontradas entre a integridade do DNA espermático e os testes funcionais e convencionais das amostras diluídas no TGC. As correlações entre os testes funcionais e convencionais das amostras diluídas no TGC foram apresentadas previamente na tabela 18.

Tabela 24 - Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espermatozoides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), porcentagem de espermatozoides classes I, II, III e IV na avaliação de integridade do DNA (COMETAI, II, III e IV), espermatozoides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozoides com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT), Vigor (VIG), Índice de Motilidade Espermática (IME), de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) mantidos em cativeiro, coletadas através de eletroejaculação e armazenadas sob refrigeração a 4°C, por 2, 12 e 24 horas, no diluidor TCM com diferentes concentrações de GSH (0; 0,5; 1,0 e 1,5mM) - Fundação Parque Zoológico do Estado de São Paulo - 2006-2007

	COMETAI	COMETAI	COMETAI	COMETAI
TBARS	-0,33 (0,048)	0,29 (0,08)	0,10 (0,56)	0,01 (0,95)
DABI	0,43 (0,01)	-0,34 (0,052)	-0,30 (0,09)	-0,15 (0,39)
DABII	-0,05 (0,8)	-0,11 (0,53)	0,08 (0,66)	-0,10 (0,59)
DABIII	-0,41 (0,02)	0,45 (0,01)	0,30 (0,09)	0,32 (0,07)
DABIV	-0,39 (0,03)	0,32 (0,07)	0,24 (0,18)	0,34 (0,06)
E/N	0,02 (0,89)	-0,02 (0,90)	0,12 (0,49)	-0,05 (0,78)
POPE	0,30 (0,12)	-0,24 (0,22)	-0,03 (0,86)	-0,008 (0,96)
MOTILIDADE	0,27 (0,10)	-0,29 (0,08)	0,05 (0,77)	-0,08 (0,64)
VIGIOR	0,25 (0,13)	-0,26 (0,12)	0,05 (0,76)	0,02 (0,91)
IME	0,27 (0,11)	-0,29 (0,09)	0,11 (0,53)	-0,03 (0,85)
COMETAI	1,0	-0,89 ($<0,0001$)	-0,62 ($<0,0001$)	-0,49 (0,002)
COMETAI	.	1,0	0,34 (0,04)	0,46 (0,005)
COMETAI	.	.	1,0	0,50 (0,002)
COMETAI	.	.	.	1,0

A variável COMETA I correlacionou positivamente com DAB I ($r=0,43$; $p=0,01$) e negativamente com TBARS, DAB III e IV ($r=-0,33$, $p=0,048$; $r=-0,41$, $p=0,02$ e $r=-0,39$, $p=0,03$; respectivamente; Tabela 24). Estes resultados indicam que quanto maior a porcentagem de células com baixa fragmentação de DNA, maior a porcentagem de

células com alta atividade mitocondrial, menor a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e células com baixa atividade mitocondrial. Estes resultados além das correlações negativas encontradas entre TBARS e as variáveis DAB I e IV (Tabela 17; $r=-0,56$; $p=0,0008$ e $r=0,36$; $p=0,04$; respectivamente; Tabela 24), sugerem que amostras mais susceptíveis ao estresse oxidativo podem apresentar danos na mitocôndria que, ao disponibilizarem uma maior quantidade de ROS no meio extracelular, potencializarão a cadeia oxidativa que, conseqüentemente, danificará o material genético. Além disso, o rompimento das mitocôndrias levará à liberação de fatores pró-apoptóticos. Os principais mecanismos que poderiam levar a um aumento na fragmentação do DNA espermático são: a apoptose e o estresse oxidativo (BERTOLLA et al., 2006). Resultados semelhantes ao presente experimento foram encontrados por Blumer et al. (2007)¹¹ com sêmen de homens com varicocele, nos quais foram encontradas correlações entre DAB III e Cometa IV ($r=0,657$, $p=0,006$), e entre DAB IV e Cometa I ($r=0,473$, $p=0,035$).

6.4 Considerações Finais

Os resultados apresentados neste experimento, mostrando uma maior produção de TBARS encontrada nas amostras espermáticas mantidas no diluidor TGC, poderiam ser interpretados erroneamente como um efeito deletério da gema de ovo. Contudo, é importante ressaltar que estes resultados são oriundos da indução da peroxidação lipídica, através de um sistema gerador de ROS formado pelo sulfato de ferro e ácido ascórbico. A utilização deste sistema visa aumentar a sensibilidade da técnica para que se possa diferenciar uma amostra mais resistente que outra ao estresse oxidativo. No entanto, os níveis produzidos de ROS por esse sistema são extremamente altos, sendo que dificilmente seriam encontrados em condições fisiológicas. Assim, mesmo que a célula incorpore os ácidos graxos poli-insaturados do ovo, dificilmente os níveis de TBARS produzidos seriam tão elevados. O que pode explicar os resultados benéficos da gema do ovo sobre a grande maioria das variáveis avaliadas mesmo com a baixa resistência ao estresse oxidativo verificado com o TBARS induzido em relação aos outros diluidores.

Em geral, no presente experimento, o tratamento com GSH não foi eficaz. Ao se pensar num tratamento antioxidante, é importante que sejam levados em conta alguns fatores. Diversos eventos fisiológicos são dependentes de processos oxidativos, sendo que a presença de altos níveis de antioxidantes pode bloqueá-los, porém níveis insuficientes podem levar ao estresse oxidativo. Sendo assim, ao testar um antioxidante,

¹¹ BLUMER, C. G.; FARIELLO, R. M.; RESTELLI, A. E.; SPAINE, D. M.; BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertility and Sterility*, 2007. 8p. Pré-print.

é importante a utilização de diferentes concentrações do mesmo. Além disso, a eficiência de um tratamento antioxidante depende da presença do estresse oxidativo. Isto pode ser confirmado pelos resultados controversos encontrados por Attaran, Pasqualotto e Falcone (2000) e Paszkowski, Clarke e Hornstein (2002). Enquanto este último grupo verificou, em mulheres fumantes, uma correlação negativa entre ROS e gravidez, Attaran, Pasqualotto e Falcone (2000), em mulheres não fumantes, encontraram uma correlação positiva entre as mesmas variáveis. Outro fator que deve ser levado em conta em relação a um tratamento antioxidante é que a produção e eliminação das ROS ocorrem numa reação em cadeia composta de diversas fases, sendo que, em geral, cada antioxidante atua especificamente em cada fase. Por conseguinte, para que o tratamento seja eficaz, é necessário que se saiba em qual etapa desta cadeia está ocorrendo o estresse oxidativo para que se utilize o antioxidante correto. Como exemplo, podemos citar o superóxido dismutase, que é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutase do O_2^- para H_2O_2 . Este, por sua vez, será eliminado pela GPx ou pela catalase. Caso seja utilizado um tratamento com SOD em amostras ricas em O_2^- , porém com baixos níveis de catalase e GPx, haverá a formação de um excesso de H_2O_2 que é um dos ROS mais deletérios, por sua alta capacidade de penetração em membranas biológicas.

No presente experimento, fortes correlações foram encontradas entre os testes convencionais e funcionais. No entanto, apenas estes últimos correlacionaram com a resistência das células ao estresse oxidativo, avaliada através de um desafio com um sistema produtor de ROS. Estes resultados podem indicar uma maior sensibilidade dos testes funcionais em relação aos testes convencionais para a avaliação da qualidade da célula espermática ou do meio em que estas se encontram. Os testes convencionais para análise do sêmen, em alguns casos, são incapazes de distinguir entre uma amostra fértil e outra infértil. Segundo Aitken (2006), isto ocorre porque os testes convencionais são incapazes de detectar deficiências funcionais responsáveis pela infertilidade.

Apesar da importância dos testes convencionais de análise espermática para o diagnóstico de infertilidade, é de fundamental importância a utilização de testes que avaliem as diferentes funções da célula espermática (IRVINE; AITKEN, 1994). Para que seja viável a aplicação prática destes testes, é muito importante que os mesmos sejam simples de serem executados, dependam o mínimo possível de equipamentos sofisticados e tenham baixo custo. Testes muito complexos limitam sua aplicação, tornando inviável a utilização fora de uma infra-estrutura laboratorial adequada. No caso de ações voltadas para o conservacionismo "*in situ*", esta poderia ser uma barreira técnica decisiva para o uso de biotécnicas reprodutivas. A maioria das técnicas de avaliação funcional da célula espermática utilizadas neste experimento (DAB, POPE e E/N), são bons exemplos de testes simples cuja aplicação a campo é viável e que trazem respostas valiosas sobre a fertilidade do animal. No entanto, algumas ferramentas são

essenciais mesmo que sua aplicação não seja tão acessível pelo custo e praticidade, como é o caso da avaliação da integridade do material genético da célula espermática.

No presente experimento, não foram encontradas correlações entre a integridade do DNA e os testes convencionais que podem indicar que mesmo com o DNA fragmentado, o espermatozóide pode vir a fecundar o oócito que, por sua vez, possui mecanismos reparos em danos de fita simples (AHMADI; NG, 1999). Estes danos podem não ser reparados completamente resultando em mutações neste DNA (AITKEN; BAKER, 2006). Caso isso ocorra podem acontecer falhas na fertilização, baixas taxas de implantação, morte embrionária precoce, aborto ou doenças genéticas na prole, incluindo câncer (BAKER; AITKEN, 2005). Mesmo que nenhum destes eventos ocorra, ainda assim, possíveis informações genéticas errôneas podem ser transmitidas e só serem expressas após várias gerações (MARCHETTI; WYROBEK, 2005).

Assim, pensando na manutenção de populações geneticamente viáveis, a avaliação da integridade de DNA espermático e o desenvolvimento de técnicas que mantenham sua integridade se torna imprescindível, principalmente, quando são formados os bancos de germoplasma voltados para o armazenamento de informação genética de espécies ameaçadas. Sabidamente a criopreservação do sêmen pode danificar o material genético. Desta forma, a utilização de sêmen proveniente destes provedores de recursos genéticos, sem uma avaliação da integridade de seu material genético, paradoxalmente estaria desvirtuando o propósito dos planos de manejo conservacionistas de populações selvagens, sendo mais prejudicial a introdução de mutações no genoma de uma população do que a própria homozigose.

6.5 Resumo dos resultados

Os resultados obtidos para as provas convencionais e funcionais, com exceção da resistência dos espermatozoides ao estresse oxidativo por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, indicaram que, em geral, o diluidor TGC foi superior aos diluidores TCM e HAM, sendo que não houve efeito do tratamento com GSH.

Em todos os diluidores as variáveis referentes aos testes funcionais apresentaram correlação com as variáveis referentes aos testes convencionais. Apenas nos diluidores HAM e TGC a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico correlacionou com a variável DAB II e as variáveis DABI, DABIV e POPE.

Nas amostras diluídas no TGC não foram verificados efeitos do tratamento com GSH, ou do tempo de refrigeração no grau de integridade do material genético das células espermáticas.

Também nas amostras diluídas em TGC, houve correlação entre a integridade do DNA e atividade mitocondrial, mas não com os testes convencionais.

CONCLUSÃO

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original".

- Albert Einstein

7 CONCLUSÃO

O sêmen do gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775) pode ser mantido sob refrigeração a 4°C, por 24 horas, no diluidor à base de gema de ovo (TGC), facilitando suas variadas aplicações através de biotécnicas reprodutivas na conservação e manutenção de populações geneticamente viáveis, sendo que o tratamento antioxidante com glutathiona reduzida não apresentou efeito sobre a qualidade deste sêmen nas concentrações utilizadas (0; 0,5; 1,0; 1,5mM).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K. R. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. **Journal of Urology**, v. 152, p. 107-110, 1994.

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 829-843, 2003.

AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. In: Carr, B. R.; TAN, S. L.; GOSDEN, R. S. **The Cryobiology of Assisted Reproduction: gametes and gonads**. Seminars in Reproductive Medicine, v. 20, n. 1, p. 15-23, 2002.

AHMADI, A.; NG, S.C. Developmental capacity of damaged spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 4, n. 9, p.2279-2285, 1999.

AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 69-75, 2006.

AITKEN, R. J. The Amoroso lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 1-7, 1999.

AITKEN R. J., BAKER M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 250, n. 1, p. 66-69, 2006.

AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 191-194, 2002.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; CARRERAS, A.; IRVINE, D. S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, p. 495-504, 1996.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparations techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 367-376, 1988.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, p.183-197, 1989.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; HARGREAVE, T. B.; IRVINE, D. S.; WU, F. C. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. **Journal of Andrology**, v. 10, p. 214-220, 1989.

AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1037-1046, 1998.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 302-315, 1993a.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993b.

AITKEN, R. J.; IRVINE, D. S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, p. 542-551, 1991.

AMANN, R. P. Cryopreservation of sperm. In: KNOBIL, E. **The Physiology of Reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1999. p. 773-783.

ATTARAN, M.; PASQUALOTTO, E.; FALCONE, T. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v. 45, n. 5, p. 314-320, 2000.

AURICH, J. E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.

AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C. Semen collection and assessment, artificial insemination in the cat. In: CONCANNON, P. W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. (Ed.) **Recent advances in small animal reproduction international veterinary information service**. Ithaca: New York, 2002. Disponível em: <<http://www.ivis.org/advances/concannon/axner/ivis.pdf>>. Acesso em: 18 nov 2005.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2000.

BAKER, M. A.; AITKEN, R. J. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. **Reproduction of Biology Endocrinology**, v. 3, p. 67, 2005.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: University Press, 1989. 285 p.

BATELLIER A. F.; VIDAMENT, B. M.; FAUQUANT, C. J.; DUCHAMPB, G.; ARNAUD, D. G.; YVON B. J. M.; MAGISTRINI, B. M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2001.

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

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. G. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003.

BECONI, M. T.; AFFRANCHINO, M. A.; SCHANG, L. M.; BEORLEGUI, N. B. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, n. 3, p. 545-553, 1991.

BELFORD, J. M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian animals. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 108-120, 1983.

BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P.; FILHO, P. A. H.; LIMA, S. B.; ORTIZ, V.; SROUGI, M. Sperm nuclear DNA fragmentation in adolescents with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 3, p. 625-628, 2006.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 951-965, 1999.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, p. 535-543, 1993.

CALAMERA, J. C.; FERNANDEZ, P. J.; BUFFONE, M. G.; ACOSTA, A. A.; DONCEL, G. F. Effect of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, v. 33, n. 2, p. 79-86, 2001.

CAPRA, F. **A teia da vida**: uma nova compreensão científica dos sistemas vivos. São Paulo: Cultrix, 1996. 256 p.

CELEGHINI, E. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CITES – Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Appendices I, II and III. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/app/appendices.pdf>>. Acesso em: 10 mar 2007.

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

CRAWSHAW, P. G. 1997. Recomendações para um modelo de pesquisa sobre felídeos neotropicais. In: VALLADARES-PÁDUA, C.; BODMER, R. E.; CULLEN, JR. **Manejo e Conservação de vida silvestre no Brasil**. Brasília, DF: CCPq; Belém, PA: Sociedade Mamirauá, 1997. p. 70-94.

DANDEKAR, S. P.; NADKARNI, G. D.; KULKARNI, V. S.; PUNEKAR, S. Lipid Peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 48, n. 3, p. 186-190, 2002.

DE LAMIRANDE, E.; EILEY D.; GAGNON, C. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 258-266, 1993.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 255-265, 1993.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 15-21, 1995.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DE PAUW, I. M. C.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; VERBERCKMOES, S.; DE KRUIF, A. Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of in vitro stored bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, n. 6, p. 1109-1122, 2003.

DONNOGHUE, A. M.; JONHSTON, L. A.; SEAL, U. S.; ARMSTRONG, D. L.; SIMMONS, L. G.; GROSS, T.; TILSON, R. L.; WILDT, D. E. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize nonspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 555-564, 1992.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p. 484-495, 1999.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species **Mutagenesis**, v. 15, n. 1, p. 61-68, 2000.

DONNELLY, E. T.; STEELE, E. K.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. N. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 16, p. 1191-1199, 2001.

DOOLEY, M. P.; MURASE, K.; PINEDA, M. H. An electroejaculator for the collection of semen from the domestic cat. **Theriogenology**, v. 20, p. 297-310, 1983.

DOOLEY, M. P.; PINEDA, M. H. Effects of method of collection on seminal plasma characteristics of the domestic cat. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 286-292, 1986.

DOOLEY, M. P.; PINEDA, M. H.; HOOPER, J. G.; HSU, W. H.; Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 687-91, 1991.

DUTY S. M.; SINGH, N. P.; RYAN, L.; CHEN, Z.; LEWIS, C.; HUANG, T.; HAUSER, R. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. **Human Reproduction**, v. 17, n. 5, p. 1274-80, 2002.

HAAS VAN DORSSER, F. J.; STRICK, J. A. Semen characteristics and sperm morphology in the Arabian Leopard (*Panthera pardus nimr*) and how these vary with age and season. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p. 675-682, 2005.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics**. Chicago: University of Chicago, 1992. v. 2, p. 163-178.

ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v. 31, n. 1, p. 17-22, 1999.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. In: DARZYNKIEWICZ, Z.; ROBINSON, J. P.; CRISSMAN, H. A. (Ed.) *Methods in cell biology*, 1994, **Flow Cytometry**. Orlando, Florida: Academic Press, 1994, v. 42, p. 159–176.

EVENSON, D.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 979-991, 2006.

ERDMANN, R. H. **Exame reprodutivo, contenção farmacológica e criopreservação de sêmen em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775)** 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

EWER, R. F. **The Carnivores**. New York: Cornell University Press, 1973. 494 p.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ESTESO, M. C.; SOLER, A. J.; MONTORO, V.; GARDE, J. J. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 2, p. 114–118, 2006.

FRASER, L.; DZIEKONSKA, A.; STRZEZEK, R.; STRZEZEK, J. Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 994-1003, 2007.

FLESH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

GADEA, J.; GARCÍA-VAZQUEZ, F.; MATÁS, C.; GARDÓN, J. C.; CÁNOVAS, S.; GUMBAO, D.; Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 3, 396-404, 2005.

GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO, M. A.; COY, P.; MATÁS, C.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v. 62, n. 4, p. 690–701, 2004.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in raw semen. **Theriogenology**, v. 59, p. 1241-1255, 2003.

GLOVER, T.E.; WATSON, P. F. The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa stored at 5°C. **Animal Reproduction Science**, v. 13, n. 3, p. 229–237, 1987.

GOODROWE, K. L.; HAY, M. Characteristic and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, n. 5, p. 967-975, 1993. abs.

GOODROWE, K. L.; HOWARD, J.; SCHIMIDT, P. M.; WILDT, D. E. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 39, p. 73-90, 1989.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247, 2001.

GRASL-KRAUPP, B.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; KOUDELKA, H.; BUKOWSKA, K.; BURSCHE, W.; SCHULTE-HERMANN, R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. **Hepatology**, v. 21, n. 5, p. 1465-1468, 1995.

GREEN, R. **Wild cat species of the world**. Plymouth, United Kingdom: Basset Publications, 1991. 163 p.

GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J. P.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, n. 1, p. 17-26, 1995.

GRIVEAU, J. F.; RENARD, P.; LE LANNOU, D. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. **International Journal of Andrology**, v. 17, p. 300-307, 1994.

HAINES, G. A.; HENDRY, J. H.; C.; DANIEL, P.; MORRIS, I. D. Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following in vivo isotopic- or X-irradiation of spermatogonia. **Mutation Research**, v. 495, p. 21-32, 2001.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 14-22, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989. p. 543.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. Cryopreservation of mammalian sperm: what do we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-87, 1990.

HARAYAMA, H.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Capacity of goat epididymal spermatozoa to undergo the acrosome reaction and subsequent fusion with the egg plasma membrane. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 239-246, 1993.

HARRIS, R. F.; GOMEZ, M. C.; LEIBO, S. P.; POPE, C. E. In vitro development of domestic cat embryos after in vitro fertilization of oocytes with spermatozoa stored for various intervals at 4°C. **Theriogenology**, v. 57, p. 365, 2002. [abstract].

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

HERMANSSON, U.; AXNER, E. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1239-1248, 2007.

HERRICK, J. R.; SWANSON, W. F. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1503-513, 2003.

HISHINUMA, M.; SUZUKI, K.; SEKINE, J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. **Theriogenology**, v. 59, n. 3, p. 813-820, 2003.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

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

HOWARD, J. G.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p. 1046-53.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

HSU, P. C.; LIU, M. Y.; HSU, C. C.; CHEN, L. Y.; GUO, Y. L. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, v. 128, n. 3, p. 169-179, 1998.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Anexo à Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003, do Ministério do Meio Ambiente**: Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/fauna/downloads/lista%20spp.pdf>>. Acesso em: 9 mar 2007.

IMAI, H.; NARASHIMA, K.; ARAI, M.; SAKAMOTO, H.; CHIBA, N.; NAKAGAWA, Y. Suppression of leucotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 1990-1997, 1998.

IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Seminal fluid analysis and sperm function testing. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.** v. 23, n. 4, p. 725-748, 1994.

ISIS – INTERNATIONAL SPECIES INFORMATION SYSTEM. **2001 abstracts**. Disponível em: <<http://156.99.114.200/abstracts/Mammalia.asp>>. Acesso em: 17 jul 2007.

IUCN – THE WORLD CONSERVATION UNION. **The 2006 IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 10 mar 2007.

IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, p. 409-416, 1992.

JANERO, D. J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRAVO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

JOHNSON, W. E.; O'BRIEN, S. J. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 44 n. 1, p. 98-116, 1997.

JOHNSTON, S. D.; ROOT KUSTRITZ, M. V.; OLSON, P. N. S. The tom. In: _____ **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p. 497-520.

JOHNSTONE, S. D. Electroejaculation in the domestic cat. **Australian Veterinary Journal**, v. 61, p. 155-158, 1984.

JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268, 1977.

KARABINUS, D. S.; EVENSON, D. P.; KAPROTH, M.T. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3836-848.

KATO, M.; MAKINO, S.; KIMURA, H.; OTA, T.; FURUHASHI, T.; NAGAMURA, Y. Evaluation of mitochondrial function and membrane integrity by dual fluorescent staining for assessment of sperm status in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 11-18, 2001.

KESSOPOULO, E.; TOMLINSON, M. J.; BARRATT, C. L. R.; BOLTON, A. E.; COOKE, I. D. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 463-470, 1994.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effects of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 151-57, 1996.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p. 1279-289, 1993.

KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. **Theriogenology**, v. 41, p. 1355-366, 1994.

KRAMER, R. Y.; GARNER, D. L.; BRUNS, E. S. A.; PRINS G. S. Comparison of motility and flow cytometer assessment of seminal quality in fresh, 24h extended and cryopreserved human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 374-384, 1993.

LARSON, K. L.; DEJONGE, C. J.; BARNES, A. M.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. **Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 1717-722, 2000.

LEME, D. P. ; PAZ, R. C. R. ; ZÜGE, R. M. ; MORATO, R. G. ; FELIPPE, P. A. N. ; BARNABE, V. H. ; BARNABE, R. C. Testicular fine needle aspiration cytology as a diagnostic tool in jaguar (*Panthera onca*) infertility. In: International Congress on Animal Reproduction, 14th, 2000, Stockolm. **Anais...** Stockolm: International Congress on Animal Reproduction, 2000. v. 1. p. 133.

LENGWINAT T.; BLOTTNER, S. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 35, n. 3-4, p. 291-301, 1994.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, p. 246-56, 1996.

LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): Scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 1-15, 2000.

LENZI, A.; FANDINI, L.; LOMBARDO, F.; PICARDO, M.; MARESCA, V.; PANFILI, E.; TRAMER, F.; BOITANI, C.; DONDERO, F. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic clinic. **Contraception**, v. 65, p. 301-304, 2002.

LEWIS, S. E. M.; STERLING, E. S. L.; YOUNG, I. S.; THOMPSON, W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 1, p. 142-147, 1997.

LEYHAUSEN, P.; FALKENA, M. Breeding the Brazilian ocelot-cat *Leopardus tigrinus* in captivity. **International Zoo Yearb**, v. 6, p. 176-182, 1966.

LI, W.; JIANG, Y.; RAJPURKAR, A.; TEFILLI, M. V.; DUNBAR, J. C.; DHABUWALA, C. B. Lipid peroxidation and antioxidant activities in rat testis after chronic cocaine administration. **Urology**, v. 54, n. 5, p. 925-928, 1999.

LILY-PALOMINO, T.; CAMACHO J. S.; HUANCA W. L.; FALCÓN N. P. Preservation of goat semen using yolk-citrate and yolk skim milk extenders. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**. v. 12, n. 1, 2001. Disponível em: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/veterinaria/v12_n1/conser_semen.htm> Acesso em 9 março 2007.

LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Detection of DNA Damage in Response to Cooling Injury in Equine Spermatozoa Using Single-Cell Gel Electrophoresis. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 107-113, 2002.

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

LUNEC, J. Oxygen radicals: their measurement in vivo. **Analytical Proceedings**, v. 26, p. 130-131, 1989.

LUVONI, G. C.; KALCHSCHIMIDT, E.; LEONI, S.; RUGGIERO, C. Conservation of feline semen. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 5, n. 4, p. 203-208, 2003.

LUVONI, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, p. 101-111, 2006.

MACHILIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, v. 1, n. 6, p. 441-445, 1987.

MARCHETTI, F.; WYROBEK, A. J.; Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 75, p. 112-129, 2005.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; LAVARA, R.; VICENTE, J. S.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. Cryopreservation of rabbit spermatozoa with freezing media supplemented with reduced and oxidised glutathione. **Cryoletters**, v. 27, n. 4, p. 261-268, 2006.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MATURANA, H.; VARELA, F.J. **A árvore do conhecimento**: As bases biológicas da compreensão humana. São Paulo: Palas Athena, 2001. 283 p.

MELLEN, J. D. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis spp.*): a multiple regression analysis. **Zoo Biology**, v. 10, p. 95-110, 1991.

MICHAEL, R. P. Observations upon the sexual behaviour of the domestic cat (*Felis catus* L.) under laboratory conditions. **Behaviour**, v. 18, p. 1-24, 1961.

MILLER, C. R.; WAITS, L. P. The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): Implications for conservation. **PNAS**, v. 100, n. 7, p. 4334-39, 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0735531100>>. Acesso em: 28 abr 2007.

MORAIS, R. N. **Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Leopardus pardalis*, LINNAEUS, 1758; *Leopardus wiedii*, SCHINZ, 1821; *Leopardus tigrinus*, SCHEREBER, 1775)**: sobre a função testicular (gametogênica e esteroidogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais. 1999. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

MORAIS, R. N.; MOREIRA, N.; MORAES, W.; MUCCILOLO, R. G.; LACERDA, O.; GOMES, M. L. F.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; BROWN, J. L. Testicular and ovarian function in South American small felids assessed by fecal steroids. In: JOINT CONFERENCE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 11., 1996, Puerto Vallarta. **Proceedings...** Puerto Vallarta: American Association of Zoo Veterinarians, 1996. p. 561-565.

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

MORAIS, R. N.; MUCCILOLO, R. G.; GOMES, M. L. F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Adrenal activity assessed by fecal corticoids and male reproductive traits in three South American felid species. In: JOINT CONFERENCE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 12., 1997, Houston. **Proceedings...** Houston: American Association of Zoo Veterinarians, 1997, p. 220-2.

MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. 2001. 232 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAIS, W.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; PASQUALI, O. L.; GOMES, M. L. F.; MORAIS, R. N.; WILDT, D. E.; BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v. 20, p. 103-116, 2001.

MUNSI, M.N.; BHUIYAN, M.M. U.; MAJUMDER, S.; ALAM, M.G.S. Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, n. 3, p. 358-362, 2007.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; SANGHA, S. P. S.; CHAUDHARY, K. C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 1, p. 21-29, 2006.

NEGOESCU, A.; GUILLERMET, C.; LORIMIER, P.; BRAMBILLA, E.; LABAT-MOLEUR, F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. **Biomedical Pharmacotherapy**, v. 52, n. 6, p. 252-258, 1998.

NEGOESCU, A.; LORIMIER, P.; LABAT-MOLEUR, F.; DROUET, C.; ROBERT, C.; GUILLERMET, C.; BRAMBILLA, C.; BRAMBILLA, E. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 9, p. 959-968, 1996.

NICHI, M. Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS. 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NORDEBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NOWAK, R. M.; PARADISO, J. L. **Walker's mammals of the world**. 5. ed. Baltimore: Johns Hopkins University, 1991. v. 2, p. 1184-1219.

O'BRIEN, S. J. Molecular genetics and phylogenetics of the Felidae. In: NOWEL, K.; JACKSON, P. **Wild cats: status survey and conservation action plan**. Cambridge: Burlington, 1996. p. 23-24.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVA, A.; BARTOLOMEO, C.; CZILLE, A.; PORSTMANN, E. Sperm motility analysis using multi-exposure photography (MEP) before and after in vitro-treatment of the semen. **Andrologia**, v. 26, n. 6, p. 439-442, 1991.

OLIVEIRA, T. J. **Neotropical cats: ecology and conservation**. São Luiz: EDUFMA, 1994. 220 p.

ONG, C. N.; SHAN, A. M.; CHIA, S. E. Biomarkers for male reproductive health hazards: Are they available? **Toxicology Letters**, v. 134, p. 17-30, 2002.

ORRENIUS, S. Reactive Oxygen Species in Mitochondria-Mediated Cell Death. **Drug Metabolism Reviews**, v. 39, n. 2, p. 443-455, 2007.

PASZKOWSKI, T.; CLARKE, R. N.; HORNSTEIN, M. D. Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. **Human Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 921-925, 2002.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryosis a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1169-1177, 2002.

PARKS, J. E., HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 653-668, 1985.

PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R.; THOMAS, A. J.; AGARWAL, A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 459-464, 2000.

PEÑA, A. I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L. A.; HERRADÓN, P. G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. **Theriogenology**, v. 50, p. 163-174, 1998.

PEÑA, F. J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J. M. Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 2, p. 21-29, 2006.

PINEDA, M. H.; DOOLEY, M. P.; MARTIN, P. A. Long term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 5, p. 1038-1041, 1984.

PLATZ, C. C.; SEAGER, W. J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 10, p. 1353-355, 1978.

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

POTO, A.; PEINADO, B.; BARBA, C.; DELGADO, J. V. Congelación de sêmen porcino dae razas autóctonas em peligro de extinción. Influencia de la metodologia em bancos de germoplasma para pequenas poblaciones. **Arch. Zootec**, v. 49, p. 493-496, 2000.

PUKAZHENTHI, B.; COMIZZOLI, P.; TRAVIS, A. J.; WILDT, D. E. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 77-90, 2006.

PUKAZHENTHI, B.; NOILES, E.; PELICAN, K.; DONOGHUE, A.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. G. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. **Criobiology**, v. 40, p. 139-150, 2000.

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

QUEIROZ, V. S. **Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatirica (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides**. 2003. 130 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

RAO, B.; SOUFIR, J. C.; MARTIN, M; DAVID, G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. **Gamete Research**, v. 24, p. 127-134, 1989.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; DE KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 706-719, 2005.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and predction of fertility: still utopia? **Reproduction of Domestic Animals**, v. 38, p. 312-318, 2003.

ROBINSON, R. Citogenetics of the felidae. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE WORLD'S CATS, 3., 1974, Washington. **Proceedings...** Washington: University of Washington, 1974. p. 63-68.

SAKKAS, D.; TOMLINSON, M. Assessment of sperm competence. **Seminar in Reproductive Medicine**, v. 18, p. 133-139, 2000.

SANTYMIRE, R. M.; MARINARI, P. E.; KREEGER, J. S.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. Slow cooling prevents cold-induced damage to sperm motility and acrosomal integrity in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 5, p. 652-663, 2007.

SANTYMIRE, R. M.; MARINARI, P. E.; KREEGER, J. S.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. Sperm viability in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) is influenced by seminal and medium osmolality. **Criobiology**, v. 53, n. 1, p. 37-50, 2006.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS The Statistical Analyze Systems for Windows** Versão 8. Cary: SAS, 1999-2001.

SEAGER, S. W. J. Electroejaculation of cats (domestic and captive wild felidae). In: KLEMM, W. R. **Applied electronics for veterinary medicine and animal physiology**. Springfield: CC Thomas, 1976, p. 410-418.

SENGOKU, K.; TAMATE, K.; YOSHIDA, T.; TAKAOKA, Y.; MIYAMOTO, T.; ISHIKAWA, M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 3, p. 522-527, 1998.

SHARMA, P. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, p. 835-850, 1996.

SHEKARRIZ, M.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species in semen. **Journal of Assisted Reproduction & Genetics**, v. 12, p. 70-74, 1995.

SHEKARRIZ, M.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. **Urology**, v. 45, p. 130-107, 1995.

SHEN, H. M.; ONG, C. N. Detection of oxidative damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 529-536, 2000.

SIDHU, R. S.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Relationship between creatinine kinase activity and semen characteristics in sub-fertile men. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v. 43, p. 192-197, 1998.

SIEMIENIUCH, M.; DUBIEL, A. Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1, p. 135-144, 2007.

SLATER, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 283-293, 1984.

SLATTERY, J. P.; JOHNSON, W. E.; GOLDMAN, D.; O'BRIEN, S. J. Phylogenetic reconstruction of South American felids defined by protein electrophoresis. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, p. 296-305, 1994.

SOJKA, N. J.; JENNINGS, L. L. Collection and utilization of cat semen for artificial insemination. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 156, p. 1250-1251, 1970.

SOJKA, N. J.; JENNINGS, L. L.; HAMNER, C. E. Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). **Laboratory Animal Care**, v. 20, p. 198-204, 1970.

SOLER, A. J.; ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; GARDE, J. J. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 °C in the epididymis for several days. **Theriogenology**, v. 64, n. 7, p. 1503–1517, 2005.

SPINDLER, R. E.; HUANG, Y.; HOWARD, J. G.; WANG, P.; ZHANG, H.; ZHANG, G.; WILDT, D. E. Acrosomal integrity and capacitation are not influenced by sperm cryopreservation in the giant panda. **Reproduction**, v. 127, p. 546–556, 2004.

SULEIMAN, S. A.; ELAMIN ALI, M.; ZAKI, Z. M. S.; EL-MALIK, A. M. A.; NASR, M. A. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 530–537, 1996.

STOKSTAD, E. Genetic rescue helps panthers but puts researchers on the spot. **Science**, v. 309, p. 1162, 2005.

SWNASON, W. F.; BROWN, J. L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v. 82, n. 8, p. 21–34, 2004.

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

SWANSON, W. F.; ROTH, T. L.; BLUMER, E.; CITINO, S. B.; KENNY, D.; WILDT, D. E. Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Panthera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Theriogenology**, v. 45, p. 241, 1996b. (abstract)

SWANSON, W. F.; WILDT, D. E.; CAMBRE, R. C.; CITINO, S. B.; QUIGLEY, K. B.; BROUSSET, D.; MORAIS, R. N.; MOREIRA, N.; O'BRIEN, S. J.; JOHNSON, W. E. 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, 10., 1995. Houston. **Proceedings...** Houston: American Association of Zoo Veterinarians, 1995, p. 374–80.

TALBOT, P.; CHACON, R. S. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. **Journal of Experimental Zoology**, v. 215, n. 2, p. 201–208, 1981.

TEBET, M. J. **Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus-Scherber, 1775*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis-Linnaeus, 1758*), e o gato doméstico (*Felis catus*)**. 2004. 145 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C. A.; ARNAUDÍN, E.; STORNELLI, M. C.; STORNELLI, M. A.; SOTA, R. L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, p. 1637–640, 2006.

TSUTSUI, T.; WADA, M.; ANZAI, M.; HORI, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 3, p. 397–99, 2003.

TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, A. S.; AITKEN, E. J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Human Reproduction**, v. 13, n. 6, p. 1429-36, 1998.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31-39, 2004.

VETTER, C. M.; MILLER, J. E.; CROWFORD, L. M.; ARMSTRONG, M. J.; CLAIR, J. H.; CONNER, M. W.; WISE, L. D.; SKOPEK, T. R. Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability. **Reproductive Toxicology**, v. 12, p. 105-114, 1998.

VILLAVERDE, A. I. S. B.; MARTINS, M. I. M.; CASTRO, V. B.; LOPES, M. D. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 1641-1644, 2006.

WANG, X.; SHARMA, R. K.; GUPTA, A.; GEORGE, V.; THOMAS, A. J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 2, p. 844-850, 2003

WATSON, P. F. Artificial insemination and the preservation of the semen. In: **Marshall's Physiology of Reproduction**. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990, v. 2, p. 747-869.

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

WATSON, P. F.; The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. In: FINN, C. A. **Oxford reviews of reproductive biology**. New York: Oxford University Press, 1979, v. 1, p. 283-330.

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

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

WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S.; HOWARD J.G.; ROTH, T. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, p. 811-824, 1995.

WILDT, D. E.; SCHIEWE, M. C.; SCHMIDT, P. M.; GOODROWE, K. L.; HOWARD, J. G.; PHILLIPS, L. G.; O'BRIEN, S. J.; BUSH, M. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. **Theriogenology**, v. 25, p. 33-51, 1986.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Washington: Smithsonian Institute, 1992. p. 291.

WHITEMAN, N. K.; MATSON, K. D.; BOLLMER, J. L.; PARKER, P. G. Disease ecology in the Galapagos Hawk (*Buteo galapagoensis*): host genetic diversity, parasite load and natural antibodies. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, v. 273, p. 797–804, 2006.

WHO - World Health Organization. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction**. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1992. p. 120.

WOOD, T. C.; SWANSON, W. F.; DAVIS, R. M.; ANDERSON, J. E.; WILDT, D. E. Functionality of sperm from normo versus terospermic cats cryopreserved in pellets or straw containers. **Theriogenology**, v. 39, p. 342, 1993.

WOUNG, W. Y.; THOMAS, M. G. L.; MERKUS, M. W. M.; ZIELHUEIS, G. A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 435-442, 2000.

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

ZAMBELLI, D.; BELLUZZI, S. Raccolta valutazione del materiale seminale di gatto. **Praxis Veterinaria**, v. 1, p. 20–22, 1998.

ZAMBELLI, D.; CANEPPELE, B.; CASTAGNETTI, C.; BELLUZZI, S. Cryopreservation of Cat Semen in Straws: Comparison of Five Different Freezing Rates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 310–313, 2002.

ZINI, A.; MAK, V.; PHANG, D.; JARVI, K. Potential adverse effect of semen processing on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p. 496-4999, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)