



Protocolos de coleta de sêmen por eletroejaculação em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) *Protocols for semen collection using electroejaculation in ocelots (Leopardus pardalis)*

E.C. Ávila¹, T.A.R. Paula^{1,3}, T. Deco-Souza¹, T.F.S.L. Trindade¹, R.M. Mascarenhas², G.R. Araujo¹,
G.O. Polli¹, A.C. Csermak Jr.¹

¹Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³Correspondência: tarcezio@ufv.br

Resumo

Este trabalho objetivou a comparação entre dois protocolos para coleta de sêmen por eletroejaculação em jaguatiricas. Foram usados seis animais, em que foi comparada a técnica convencionalmente usada para felídeos e uma técnica na qual se preconizam a lavagem da bexiga previamente à coleta e a aplicação de menor número de estímulos elétricos, com uma voltagem mais alta (16V). Com o protocolo proposto obteve-se, em média, um valor seis vezes maior para volume espermático e 18 vezes maior para o total de espermatozoides por ejaculado, além disso o procedimento de coleta pôde ser realizado mais rapidamente, sem que as amostras se contaminassem com urina.

Palavras-chave: felídeo, jaguatirica, reprodução assistida.

Abstract

The aim of this study was to compare two electroejaculation protocols for semen collection in ocelots. Six animals were used, which was compared the technique conventionally recommended for felines and a technique which indicates the cleansing of the bladder prior to collection and a smaller number of electrical stimuli but with a higher voltage (16V). With the proposed protocol we obtained an average value 6 times higher for sperm volume and 18 times higher for the total number of sperm per ejaculate, besides the collection procedure is carried out more quickly, without the samples being contaminated with urine.

Keywords: assisted reproduction, felidae, jaguatirica.

Introdução

A jaguatirica é um felino que ocorre em todo o continente americano, do sul do Texas ao norte da Argentina, e no Brasil é encontrada em todas as regiões, exceto no sul do Rio Grande do Sul (Murray e Gardner, 1997; Oliveira e Cassaro, 1999). Devido à destruição de seu hábitat e à caça predatória, principalmente voltada para o comércio de pele, essa espécie é considerada criticamente em perigo no estado de Minas Gerais (Machado et al., 1998) e está listada no Apêndice I da Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora – CITES (2010).

Embora coletas de sêmen em gatos domésticos possam ser realizadas com o uso de uma vagina artificial (Axné e Linde-Forsberg, 2002), em felinos selvagens a eletroejaculação é o método mais recomendado para obtenção de sêmen, devido à dificuldade no condicionamento desses animais. Diversos protocolos de eletroejaculação foram descritos para felinos. Wildt et al. (1983) desenvolveram um protocolo que consiste na aplicação de oito séries com tensões de 2 a 6 V, organizadas em três sequências, totalizando 80 estímulos com três segundos de duração cada. Já Howard et al. (1986) descreveram um protocolo que consiste na aplicação de um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 5 V, aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos), sendo cada estímulo é aplicado de forma a demorar aproximadamente 1 s para ir de 0 V à voltagem desejada e a durar aproximadamente de 2 a 3 segundos, havendo entre um estímulo e outro há um intervalo de 2 a 3 segundos. Esses protocolos têm sido usados como modelo para a coleta de sêmen em várias espécies de felinos selvagens, como a onça parda, *Puma concolor* (Miller et al., 1990), a onça pintada, *Panthera onca* (Morato, 1998), e a jaguatirica, *Leopardus pardalis* (Platz e Seager 1978; Queiroz, 2003; Tebet, 2004; Baudi, 2005).

Devido à estimulação das glândulas acessórias, ejaculados obtidos por eletroejaculação em felinos, geralmente, possuem maior volume, menor concentração e menor número de espermatozoides totais, quando comparados aos obtidos por vagina artificial (Axné e Linde-Forsberg, 2002), e frequentemente as amostras são contaminadas com urina (Queiroz, 2003; Swanson et al., 2003; Baudi, 2005).

Objetivou-se desenvolver um protocolo de eletroejaculação para jaguatiricas que reduza a quantidade de estímulos elétricos necessários para a coleta e a contaminação com urina, bem como compará-lo com o preconizado na literatura para felinos.



Material e Métodos

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

Foram usadas seis jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) adultas mantidas em cativeiro, sendo dois animais mantidos em criadouro conservacionista credenciado no município de Belo Horizonte, MG, (Jaguaririca 1 e Jaguaririca 2), dois animais provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV; Jaguaririca 3 e Jaguaririca 4) e dois animais mantidos na Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte (Jaguaririca 5 e Jaguaririca 6). Todos os animais chegaram ao cativeiro já adultos, não sendo possível determinar-lhes a idade. Esses são mantidos em recintos individuais, sem atividade sexual.

Para a realização da coleta, os animais foram contidos quimicamente, mediante o uso de dardos anestésicos, projetados por rifle de ar comprimido, com a associação de cloridrato de quetamina (10 mg/kg, Dopalen®, Vetbrands, SP-Brasil) e cloridrato de xilazina (2 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands, SP-Brasil) via intramuscular. Durante todo o procedimento, os animais foram monitorados até que conseguissem manter-se em estação, garantindo uma recuperação pós-anestésica segura.

Os procedimentos de coleta de sêmen foram realizados por meio de um aparelho eletroejaculador (Eletrogen SA200®, Santa Lydia, SP-Brasil) acoplado a um transdutor retal de 9 cm de perímetro, com de três eletrodos longitudinais. O transdutor foi devidamente lubrificado, e uma extensão de aproximadamente 10 cm foi introduzida no reto do animal com os eletrodos longitudinais posicionados ventralmente. O pênis foi exposto e aproximado a um tubo de polipropileno previamente aquecido à temperatura de 38°C, sendo este trocado a cada série de estímulos. Para o cálculo do volume de ejaculado coletado, considerou-se apenas o volume espermático, ou seja, foram descontados os volumes de plasma seminais aspérmicos ou oligospérmicos.

Dois protocolos de eletroejaculação foram testados: o protocolo A (descrito por Wildt et al., 1983), em que foi aplicado um total de 80 estímulos elétricos variando de 2 a 6 V, aplicados em três séries de 30, 30 e 20 estímulos, e o protocolo B (protocolo proposto), em que, previamente à coleta, para evitar contaminação do sêmen pela urina, a bexiga de cada animal foi esvaziada e lavada com solução de cloreto de sódio a 0,9%. Para o procedimento de esvaziamento da bexiga, introduziu-se uma sonda uretral nº6 (Medsonda®, PR - Brasil) na uretra do animal e, com o auxílio de uma seringa de 10 mL, foi retirado o máximo de urina possível. Posteriormente, para a lavagem da bexiga, com o auxílio da mesma seringa usada anteriormente, injetaram-se 10 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% aquecida a 37°C, que foi imediatamente retirada por meio do mesmo mecanismo. Realizou-se o procedimento de lavagem até que o líquido retirado tivesse coloração transparente. Para a eletroejaculação, foram aplicadas de cinco a sete séries cada uma, com cinco estímulos idênticos de 16 V, tendo cada estímulo a duração de, no máximo, 3 s, com intervalo de 3 s entre eles e intervalo de 1 minuto entre cada série.

O protocolo A foi realizado em seis jaguatiricas, enquanto o protocolo B foi realizado em quatro jaguatiricas, sendo realizadas três coletas por animal por protocolo. O intervalo mínimo entre as coletas em cada animal foi de 15 dias, sendo realizados primeiramente os procedimentos usando o protocolo A.

Logo após coletado, o volume do ejaculado foi mensurado utilizando-se uma micropipeta de volume ajustável. Imediatamente após essa análise, foi colocada uma gota do material em uma lâmina que foi coberta com lamínula, ambas previamente aquecidas a 38°C a fim de evitar choque térmico. Em seguida, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade espermática progressiva (percentual de espermatozoides móveis, de zero a 100%) e ao vigor, este em uma escala de zero a cinco, utilizando-se um microscópio de luz monocular portátil (Artificial inseminaton Handycoppe®, Freedom & Challenge, Coreia do Sul) em aumento de 100x.

Para o cálculo da concentração (espermatozoides/mL), o sêmen foi diluído em água destilada na proporção 1:100 e uma alíquota dessa diluição foi depositada em câmara de Neubauer espelhada, para contagem dos espermatozoides em microscópio óptico (400x). A concentração (C) foi determinada pela fórmula ($C = \text{número de espermatozoides} \times 5 \times 10^6$). O número total de espermatozoides por ejaculado (NE) foi calculado utilizando-se a fórmula: $NE = C \times V$, em que C é a concentração espermática e V é o volume do ejaculado. Foi calculado, também, o índice espermático pela fórmula: $IE = [M + (V \times 20)] / 2$, em que M representa a motilidade e V o vigor espermático (Howard et al., 1993).

Para realização da análise estatística, foram calculados valores de média (M), desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV) e intervalo de confiança (IC) com estimativa de 5% de erro. Para avaliar os dados obtidos na análise de sêmen entre os dois protocolos de eletroejaculação, foi usado o Teste F a 5% de significância. Os cálculos foram realizados no programa Microsoft Office Excel® (2003).

Resultados e Discussão

O protocolo de eletroejaculação que tem sido utilizado como modelo para coleta de sêmen em várias espécies de felinos selvagens foi descrito por Wildt et al. (1983) para coleta de sêmen de guepardos (*Acinonyx jubatus*). Essa técnica é baseada em uma grande quantidade de estímulos elétricos, por meio de eletrodo retal, em intensidade crescente, porém, na maioria dessas espécies, é relatada com frequência contaminação com urina



(Queiroz, 2003). Na presente experimentação, ao se usar o protocolo A, obteve-se contaminação por urina em aproximadamente 30% das amostras. Morais et al. (2002) e Queiroz (2003), também usando os protocolos de eletroejaculação convencionais, relataram em jaguatiricas uma grande contaminação com urina (69 a 75% das amostras coletadas), sendo que as amostras coletadas com motilidade inferior a 60% e vigor 3 são geralmente consideradas suspeitas de contaminação com urina (Queiroz, 2003). Em vista desses resultados nas presentes experimentações, optou-se, no protocolo B, pelo esvaziamento e lavagem da bexiga com solução fisiológica estéril, previamente às coletas, as quais eliminaram a contaminação do sêmen com a urina, sem causar problemas urinários nos animais posteriormente aos procedimentos.

Em jaguatiricas, não raramente são obtidas coletas aspérmicas e ou oligospérmicas contendo apenas plasma seminal ou apenas uma quantidade ínfima de espermatozoides (Queiroz, 2003). Neste sentido, a maioria dos autores considera, para o cálculo do volume do ejaculado, apenas os volumes espermáticos coletados (Howard, 1993; Morais et al., 2002; Queiroz, 2003; Swanson et al., 2003; Baudi, 2005). Embora Morais et al. (2002) descrevam frações espermáticas médias de 1,4 mL para jaguatiricas, os demais autores descrevem, nessa espécie, valores menores e muito próximos entre si, com o uso da técnica convencional. Assim, Howard (1993) descreve, para o protocolo A, uma média de 0,3 mL, Queiroz (2003) 0,4 mL, Swanson et al. (2003) 0,6 mL, Baudi (2005) 0,66 e o presente estudo 0,2 mL. Ainda considerando esse protocolo, a média do total de espermatozoides coletados (Tab. 1) foi menor que a encontrada em outros trabalhos com essa espécie, $57,8 \times 10^6$ (Queiroz, 2003) e $98,57 \times 10^6$ (Tebet, 2004).

Tabela 1. Avaliação de sêmen a fresco utilizando-se dois protocolos de eletroejaculação, protocolo A (n = 6) e protocolo B (n = 4).

Parâmetro aferido	Protocolo A Média ± DP (CV) (n' = 18)*	Protocolo B Média ± DP (CV) (n' = 12)*
Volume espermático (mL)	0,2 ± 0,1 ^a (5,0)	1,2 ± 0,7 ^b (58,3)
Concentração espermática (espermatozoides x 10 ⁶ /mL)	134,0 ± 154,9 ^a (114,9)	456,6 ± 198,5 ^b (43,5)
Total de espermatozoides/ejaculado (espermatozoides x 10 ⁶)	37,1 ± 48,4 ^a (130,4)	667,3 ± 383,5 ^b (57,4)
Motilidade espermática (%)	79,3 ± 7,7 ^a (9,7)	88,7 ± 2,5 ^b (2,8)
Vigor (0-5)	4,3 ± 0,2 ^a (4,7)	4,0 ± 0,7 ^a (17,5)
Índice espermático	83 ± 4,5 ^a (5,4)	84,4 ± 8,3 ^a (9,8)

n = número de animais; n' = número de coletas

*Médias com letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P < 0,05) pelo Teste F.

Com relação à técnica proposta (protocolo B), foram obtidos, em média, maior volume espermático, maiores concentrações e, conseqüentemente, maiores quantidades totais de espermatozoides coletados em relação ao protocolo A (P < 0,05) (Tabela 1).

A eletroejaculação baseia-se na estimulação dos nervos ligados aos órgãos reprodutores, inclusive as glândulas sexuais acessórias (Áxner e Linde-Forsberg, 2002). A maior voltagem usada no protocolo proposto possivelmente foi mais eficaz em estimular os órgãos reprodutores, promovendo a ejaculação de uma quantidade maior de espermatozoides. Além disso, os protocolos de coleta convencionais imprimem um maior número de estímulos às glândulas acessórias, o que pode ter resultado em ejaculados menos concentrados em relação ao protocolo proposto.

A avaliação qualitativa de uma amostra de sêmen considera classicamente a motilidade espermática e o vigor, na classificação e correlação com a capacidade fecundante. Esses métodos são subjetivos e, embora muitos autores os considerem insatisfatórios (Goodrowe e Hay, 1993; Howard, 1993), são amplamente utilizados. No sentido de estabelecer um índice que considera ao mesmo tempo a motilidade e o vigor espermáticos, foi sugerido o índice espermático que expressa percentualmente a média resultante desses dois parâmetros. No presente estudo, embora uma diferença tenha sido observada entre a motilidade média das amostras obtidas nos dois diferentes protocolos testados (P < 0,05), não foram observadas diferenças no vigor e no índice espermático (P > 0,05) (Tabela 1). Em ambos os protocolos avaliados, esses valores se mostraram satisfatórios e próximos aos registrados na literatura para o sêmen fresco de jaguatirica, que varia de 70,7 a 77,6% (Morais et al., 2002; Swanson et al., 2003).

Com o protocolo sugerido, pôde-se obter, em média, aproximadamente 18 vezes mais espermatozoides por coleta em relação ao protocolo A, utilizando-se menor quantidade de estímulos (Tabela 1). Desta forma, foi



possível obter procedimentos de coleta de sêmen por eletroejaculação mais eficientes em menor tempo de anestesia, sem prejudicar a qualidade espermática. Soma-se a isso o fato de que, com os procedimentos de esvaziamento e lavagem da bexiga, pôde-se eliminar as contaminações dos ejaculados com urina, aumentando a eficácia dos procedimentos.

Conclusão

O protocolo proposto no presente trabalho (protocolo B) mostrou-se eficaz na obtenção de ejaculados sem contaminação por urina em jaguatiricas. O uso de um menor número de estímulos, porém com maior voltagem, foi eficiente na obtenção de ejaculados com maior concentração e volume espermático.

Referências

- Axner E, Linde-Forsberg C.** Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In: Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Fosber C (Ed.). Recent advances in small animal reproduction. Ithaca: IVIS, 2002. (Document No. A1228,0702). Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Concannon/axner/chapter_frm.asp?LA=1. Acesso em: 16 ago. 2011.
- Baudi DLK.** Efeito de dois métodos de resfriamento sobre a função espermática in vitro de sêmen criopreservado de felinos (*Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e *Felis catus*), avaliada através de ensaio competitivo de ligação em ovócitos de gata doméstica (*Felis catus*). 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora.** Species Databases. Disponível em: <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>. Acesso em: 25 nov. de 2011.
- Goodrowe KL, Hay M.** Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v.40, p.967-975, 1993.
- Howard JG.** Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In: Fowler ME (Ed.). Zoo and wild animal medicine. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p.390-398.
- Howard JG, Bush M, Wildt DE.** Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow DA. Current therapy in theriogenology 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.1047-1053.
- Machado ABM, Fonseca GAB, Machado RB, Aguiar LM, Lins LV.** Livro brasileiro das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998. 608p.
- Miller A.M., Roelke M.E., Goodrowe K. L., Howard J.G. & Wildt D.E.** Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (*Felis concolor*). *J. Reprod Fertil*, v.88, p.249-258, 1990.
- Morais RN, Mucciolo RG, Gomes MLF, Lacerda O, Moraes W, Moreira N, Graham LH, Swanson WF, Brown JL.** Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology*, v.57, p.2027-2041, 2002.
- Morato RG, Guimarães MABV, Nunes ALV, Carciofi AC, Ferreira F, Barnabe VH, Barnabe RC.** Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.35, p.178-181, 1998.
- Murray JL, Gardener GL.** *Leopardus pardalis*. *Mammalian Species*, v.548, p.1-10, 1997.
- Oliveira TG, Cassaro, K.** Guia de identificação de felinos brasileiros. 2.ed. São Paulo: Sociedade de Zoológicos, 1999.
- Platz CC, Seager SWJ.** Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J Am Vet Med Assoc*, v.173, p.1353-1355, 1978.
- Queiroz VS.** Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.
- Swanson WF, Johnson WE, Cambre RC, Citino SB, Quigley KB, Brousset DM, Moraes RN, Moreira N, O'Brien SJ, Wildt DE.** Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for *ex situ* conservation. *Zoo Biol*, v.22, p.421-441, 2003.
- Tebet JM.** Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* – Schreber, 1775), a jaguatirica (*Leopardus pardalis* – Linnaeus, 1758) e o gato doméstico (*Felis catus*). 2004. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2004.
- Wildt D E, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, Van Dyk A. Ebedes H, Brand DJ.** Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol Reprod*, v.29, p.1019-1025, 1983.