

Avaliação da capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos *

Penetration assay of frozen jaguar (*Panthera onca*) sperm in heterologous oocytes

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Regina Celia Rodrigues da Paz
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP
Cidade Universitária Armando de Salles
Oliveira
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
05508-000 – São Paulo – SP
e-mail: repaz@usp.br

1-Departamento de Reprodução Animal
da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP – SP
2-Bosque dos Jequitibás, Campinas – SP

Regina Celia Rodrigues da PAZ¹; Roberta Mara ZÜGE¹; Valquíria Hyppolito BARNABE¹;
Ronaldo Gonçalves MORATO¹; Paulo Anselmo Nunes FELIPPE²; Renato Campanarut BARNABE¹

RESUMO

A aplicação de técnicas de reprodução assistida em espécies selvagens ameaçadas de extinção surge como método alternativo com o intuito de minimizar a diminuição da variabilidade genética das populações. Com o objetivo de determinar a fertilidade de onças pintadas (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro e avaliar a eficácia dos meios de capacitação espermática, foi realizado o ensaio de penetração em oócitos de hamster livres de zona pelúcida. Para a realização do experimento, foi utilizado sêmen congelado de 3 animais do Bosque dos Jequitibás, Campinas/SP. Foram testadas 3 técnicas: Percoll, Swim-up e Swim-up + 1 hora em estufa de CO₂ a 38°C, considerando como oócitos penetrados aqueles que apresentaram no seu interior a descondensação da cabeça do espermatozóide. A média de penetrações da técnica Percoll (26,5%) foi significativamente maior comparada à técnica Swim-up (8,1%), sendo que não houve penetração utilizando a técnica Swim-up + 1 hora em estufa de CO₂ a 38°C ($\chi^2 = 19,93$; $p < 0,05$). Analisando os resultados, concluímos que as técnicas Percoll e Swim-up foram eficientes para a realização do ensaio de penetração, comprovando a capacidade de penetração dos espermatozoides de onças pintadas (*Panthera onca*), pós-descongelamento, em oócitos de hamster livres de zona pelúcida. Porém, houve uma baixa porcentagem de penetração, a qual pode estar associada ao elevado índice de espermatozoides morfológicamente anormais. Mais estudos devem ser conduzidos com a finalidade de avaliar a fertilidade destes animais e até que ponto a variabilidade da espécie pode estar comprometida.

UNITERMOS: *Panthera onca*; Sêmen animal; Criopreservação animal; Capacitação espermática; Ensaio de penetração; Oócitos.

INTRODUÇÃO

A ameaça de extinção pesa seriamente sobre os grandes felinos, inclusive alguns dos maiores e mais importantes deles, que têm por habitat diferentes regiões do Brasil. A onça pintada (*Panthera onca*), que em outros tempos habitou vastas extensões da América, do Arizona, nos Estados Unidos, ao nordeste da Argentina, hoje se encontra na lista de animais ameaçados ou em perigo de extinção¹⁰. Nesse sentido, a aplicação de técnicas de reprodução assistida em espécies selvagens ameaçadas de extinção, como inseminação artificial e fertilização *in vitro*, surge como método alternativo com o intuito de minimizar

a diminuição da variabilidade genética das populações. A habilidade para fertilizar oócitos *in vitro* tem como vantagem a maior produção de animais ameaçados de extinção, a maior produção de animais provenientes de mães de alto valor genético, já mortas, podendo ainda ser utilizada para avaliar a fertilidade dos animais⁷. Várias técnicas têm sido desenvolvidas para melhorar e simplificar processos de fertilização *in vitro* em mamíferos. A técnica de penetração dos espermatozoides de vários animais, em oócitos de hamster livres de zona pelúcida¹, tem sido utilizada, por ser de fácil visualização, apresentando citoplasma translúcido e pró-núcleo facilmente visualizado em lupa. No entanto, em alguns animais, como em búfalos¹⁸, não foi possível observar a

* Financiamento: FAPESP.

formação de pró-núcleos, sendo visualizada apenas a descondensação da cabeça do espermatozóide.

MATERIAL E MÉTODO

Colheita e Avaliação do Sêmen

Os animais foram anestesiados por meio da utilização de dardos, com auxílio de zarabatana, utilizando-se a associação Tiletamina-Zolazepan, na proporção de 10 mg/kg¹⁵.

O sêmen foi coletado por eletroejaculação, utilizando-se eletrodo retal com fibras longitudinais, previamente lubrificado. Foram utilizados 80 estímulos elétricos divididos em 3 séries: 30 (série 1: 10 estimulações em 2, 3 e 4v), 30 (série 2: 10 estimulações em 3, 4 e 5v) e 20 (série 3: 10 estimulações em 5 e 6v), respectivamente. O ciclo dos estímulos foi de aproximadamente 1 segundo, indo da voltagem 0 até a desejada, permanecendo 2 a 3 segundos na voltagem desejada e retornando diretamente para a voltagem 0 por 3 segundos. Houve descanso de 10 minutos entre as séries. O sêmen foi colhido em tubos de plástico e mantido em banho-maria a 37°C¹⁰. O volume do ejaculado foi determinado imediatamente após a colheita. Para determinar o volume total, foram somadas as alíquotas obtidas em cada uma das três séries.

Para a obtenção do pH, uma gota do material obtido foi colocada sobre tira reagente (Sigma). Para avaliar a motilidade, uma alíquota do ejaculado foi depositada sobre lâmina de vidro para microscopia, previamente aquecida a 37°C em mesa aquecedora, coberta com lamínula também aquecida a 37°C e levada ao microscópio ótico binocular. Sobre placa aquecida a 37°C, foi avaliada quanto à motilidade espermática em escala de 0 a 100% e vigor na escala de 0 a 5¹⁰. A morfologia e concentração dos espermatozoides foi avaliada por meio da fixação do ejaculado (1:3) em formol salino 10%. A concentração foi realizada utilizando-se câmara hematimétrica (câmara de Neubauer), sob microscopia óptica em aumento de 400x⁶. Para a determinação da morfologia espermática foi utilizada preparação em câmara úmida. Foram contadas 100 células por lâmina em microscópio de contraste de fase, em aumento 1.000 vezes, e as anormalidades, classificadas em defeitos maiores e defeitos menores, apresentadas em porcentagem².

Criopreservação do Sêmen

Para a criopreservação do sêmen foi utilizado diluidor PDV 62 GH 4% em duas frações: fração A contendo 20% de gema de ovo, 11% de lactose, 1.000 UI de Penicilina/ml e 1.000 mg de Estreptomicina/ml e fração B contendo 20% de gema de ovo, 11% de lactose, 8% de

glicerol, 1.000 UI de Penicilina/ml e 1.000 mg Estreptomicina/ml⁵. Após avaliação, o sêmen foi diluído na proporção 1:1 em meio de cultura de células HEPES e centrifugado a 300 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspensão lentamente na fração A do diluidor PDV 62 GH 4%⁵ e mantido em geladeira por 1 hora. Após esse intervalo, foi acrescentada a fração B, lentamente. O sêmen foi envasado em palhetas, previamente identificadas, de 0,25 ml e mantidas por 30 minutos em geladeira. Após esse período, as palhetas foram colocadas sob vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos, submersas no nitrogênio líquido e conservadas em botijão de nitrogênio líquido até a realização do ensaio de penetração.

Ensaio de penetração em oócitos de hamster livres de zona pelúcida

As hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram superovuladas pela administração de injeção intraperitoneal com 35 UI de PMSG às 9 horas do dia 1 e com 35 UI de hCG às 17 horas do dia 3, sendo a remoção dos oócitos realizada às 10 horas do dia 4. Após o sacrifício dos animais, os ovidutos direito e esquerdo foram retirados, colocados em placas de Petri descartáveis contendo gotas de 100 µl de meio HEPES e levados ao fluxo laminar. Sob lupa, foram dilacerados, com auxílio de uma agulha (30 x 7) descartável, para promover a saída dos oócitos e células do cúmulo, os quais foram retirados e colocados em uma nova placa contendo gotas de HEPES. Foi adicionado 1 mg/ml de hialuronidase em cada gota para promover a saída das células do cúmulo. Os oócitos foram então aspirados e lavados três vezes em meio HEPES¹. Tripsina foi adicionada para promover a remoção da zona pelúcida¹⁷. Após alguns minutos em meio HEPES com tripsina, os oócitos foram aspirados e colocados em placas contendo meio TALP na proporção 15 oócitos para cada gota de 100 µl e cobertas com óleo mineral.

O sêmen foi descongelado a 39°C por 1 minuto e avaliado quanto à motilidade e vigor. Para o teste de capacitação espermática foram utilizadas 3 técnicas: Percoll, Swim-up e Swim-up + 1 hora em estufa de CO₂ a 38°C.

A técnica do Percoll consiste em colocar 1 ml de Percoll 90%, uma mistura homogeneizada de 0,5 ml Percoll 90% e 0,5 ml de meio TALP em um tubo, de maneira a formar dois gradientes e deixar estabilizar por uma hora em placa aquecida. Colocar o sêmen descongelado sobre o tubo, centrifugar por 30 minutos a 8 g, desprezar o sobrenadante e diluir o pellet em meio TALP.

A técnica do Swim-up consiste em diluir o sêmen na proporção 1:1 em meio TALP modificado e centrifugar por 10 minutos a 100 g. Após a centrifugação, o sobrenadante é desprezado e ao pellet é adicionado meio

TALP na proporção 1:1 e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos.

A técnica do Swim-up + 1 hora em estufa de CO₂ a 38°C somente difere da anterior por manter o pellet, após adição de meio TALP, 1 hora em estufa de CO₂ a 38°C.

Em cada gota de 100 µl contendo 15 oócitos foram adicionados 25 µl do sêmen contendo 50.000 espermatozoides vivos. As placas foram mantidas em estufa de CO₂ por 3 horas.

Após esse período, com auxílio da lupa, os oócitos foram retirados de cada gota, colocados em lâmina, corados com orceína acética e lacrados com esmalte após a colocação da lamínula. Em seguida, os oócitos foram examinados sob microscopia de contraste de fase.

RESULTADOS

Foram considerados como oócitos penetrados aqueles que apresentaram no seu interior a descondensação da cabeça do espermatozoide¹⁸ (Fig. 1). Os resultados obtidos estão apresentados na Tab. 1. Os dados referentes à avaliação

espermática pré-congelação estão relacionados na Tab. 2. Anormalidades espermáticas estão apresentados na Tab. 3. Dados referentes à motilidade e vigor espermáticos antes e após a congelação estão apresentados na Tab. 4.

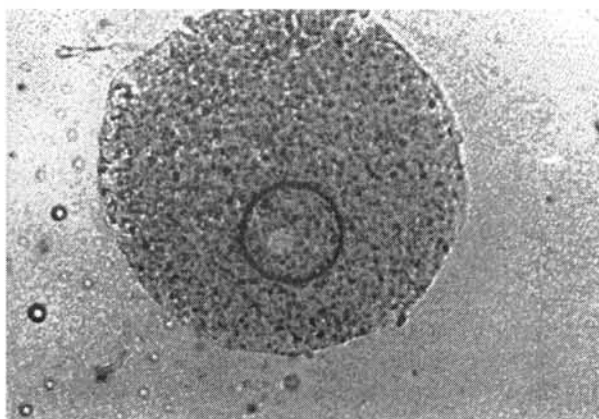


Figura 1

Espermatozoide de onça pintada (*Panthera onca*) com a cabeça descondensada no interior de oócito heterólogo.

Tabela 1

Porcentagem de penetração, de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onca*), em oócitos de hamster livres de zona pelúcida, utilizando as técnicas Percoll, Swim-up e Swim-up + 1h em estufa de CO₂ a 38°C, São Paulo, 1999.

Animais	Percoll	Swim-up	Swim-up + 1h em estufa CO ₂ a 38°C
1	36,0% (23/64)	8,0% (4/50)	0% (0/50)
2	26,1% (6/23)	44,5% (4/9)	0% (0/11)
3	17,4% (9/52)	7,5% (11/148)	0% (0/19)
Porcentagem Total de penetrações	x = 26,5% (38/139) ^a	x = 8,1% (19/207) ^b	x = 0% (0/80) ^c

$\chi^2 = 19,93$; $p < 0,05$; ^{a,b,c} = Diferentes estatisticamente.

Tabela 2

Avaliação, pré-congelamento, do sêmen de onças pintadas (*Panthera onca*), mantidas em cativeiro, São Paulo, 1999.

Animais	Volume	Motilidade	Vigor	pH	Concentração
1	21 ml	70 %	3	7,0	0,1 x 10 ⁶ /ml
2	7 ml	90 %	5	7,5	25,0 x 10 ⁶ /ml
3	5 ml	70 %	3	7,0	6,0 x 10 ⁶ /ml
M/DP	11 ± 8,7	76,7 ± 11,5	3,7 ± 1,2	7,2 ± 0,3	10,4 ± 13,0

Tabela 3

Anormalidades espermáticas do sêmen de onças pintadas (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro, São Paulo, 1999.

Animais	Normais	Anormais	Defeitos maiores	Defeitos menores
1	42%	58%	44%	14%
2	23%	77%	76%	1%
3	30%	70%	51%	19%
M/DP	31,7 ± 9,6	68,3 ± 9,6	57 ± 16,8	11,3 ± 9,29

Tabela 4

Análise do sêmen de onças pintadas (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro, pré e pós-congelação, São Paulo, 1999.

Animais	Pré		Pós	
	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor
1	70 %	3	50%	3
2	90 %	5	20%	3
3	70 %	3	20%	2
M/DP	76,7 ± 11,5	3,7 ± 1,2	30 ± 17,3	2,7 ± 0,6

DISCUSSÃO

A média de penetrações da técnica Percoll (26,5%) foi

significativamente maior comparada à técnica Swim-up (8,1%), sendo que não houve penetração utilizando a técnica Swim-up + 1 hora em estufa de CO₂ a 38°C ($\lambda^2 = 19,93$; $p <$

0,05).

Byers *et al.*³ observaram que a porcentagem de penetrações de sêmen congelado de tigre (*Panthera tigris*) em oócitos de hamster livres de zona pelúcida, sem pré-incubação em estufa de CO₂, foi de 7,6 ± 5,6%, enquanto, após 2 horas de incubação, não houve penetração (0%). Em nosso experimento, resultado semelhante foi encontrado para onça pintada (*Panthera onca*), em que a utilização da técnica Swim-up com meio TALP e pré-incubação de 1 hora em estufa de CO₂ a 38°C não foi eficiente, não determinando penetração, sendo a taxa de penetração sem pré-incubação de 8,1%.

Em estudo realizado em gatos domésticos, normospermicos e teratospermicos, em relação à penetração em oócitos de hamster livres de zona pelúcida e oócitos homólogos com zona pelúcida intacta, verificou-se que a porcentagem de penetração do grupo normospermico foi significativamente maior (21,1% e 58,1%) comparada à do grupo teratospermico (5,6% e 16,9%)⁹.

A porcentagem de penetração em oócitos de hamster livres de zona pelúcida obtida foi menor, quando comparada à encontrada por Howard *et al.*⁹ utilizando sêmen congelado de gatos domésticos normospermicos (21,1%), porém, maior que a determinada por estes autores para gatos domésticos teratospermicos e para sêmen congelado de tigres (*Panthera tigris*) (7,6 ± 5,6%)³.

Podemos notar que em felinos, de maneira geral, há uma baixa porcentagem de penetração, a qual pode estar associada ao elevado índice de espermatozoides morfologicamente anormais. A análise da morfologia espermática, em nosso experimento, mostrou elevado índice de espermatozoides anormais 68,3 ± 9,6%.

A literatura apresenta poucos trabalhos avaliando sêmen de onças (*Panthera onca*). Porém, os resultados obtidos indicam que os animais estudados podem estar comprometidos quanto à fertilidade^{4,14,15}. O número de espermatozoides anormais encontrados em onça pintada (*Panthera onca*) variou de 33,7%¹⁴ a 41,8%¹⁰. Em estudo recente, realizado em zoológicos brasileiros, a morfologia espermática mostrou elevado índice de espermatozoides anormais (53,3%)¹⁵, sendo que esses

resultados podem indicar comprometimento com a fertilidade.

As causas da baixa qualidade espermática e elevado índice de espermatozoides morfologicamente anormais são de difícil avaliação. Geralmente as alterações de qualidade espermática estão diretamente relacionadas a três grandes fatores: genéticos, nutricionais e ambientais.

A baixa qualidade espermática com mais de 75% de espermatozoides anormais tem sido associada à baixa variabilidade genética em guepardos (*Acinonyx jubatus*)¹⁹. Em pantera da flórida (*Felis concolor coryi*), subespécie de puma que apresenta elevado grau de consanguinidade e concomitante perda de variabilidade genética, a incidência de espermatozoides anormais está em torno de 95%¹⁶. A realização de análise de variabilidade genética e/ou o estudo de paternidade podem contribuir substancialmente para a elucidação da causa da baixa qualidade espermática, já que os animais estudados são de origem desconhecida.

O elevado índice de anormalidades espermáticas, em onças pintadas (*Panthera onca*), mantidas em cativeiro, pode estar relacionado a deficiências de vitamina A e E¹⁵. Alterações e redução na espermatogênese foram associadas à deficiência dessas vitaminas^{8,11,12}.

Fatores ambientais também podem promover alterações na qualidade espermática. O tipo de recinto, o número de animais por recinto e a interação tratador-animal são determinantes para o sucesso reprodutivo de felinos em cativeiro¹³. Mais estudos devem ser conduzidos com a finalidade de avaliar a fertilidade destes animais e até que ponto a variabilidade da espécie pode estar comprometida.

Analisando os resultados, concluímos que a técnica do Percoll sem capacitação em estufa de CO₂ a 38°C foi mais eficiente para a realização do ensaio de penetração, comprovando a capacidade de penetração dos espermatozoides de onças pintadas (*Panthera onca*), pós-congelamento, em oócitos de hamster livres de zona pelúcida.

AGRADECIMENTOS

Bosque dos Jequitibás – Campinas/SP.

SUMMARY

Assisted reproductive technologies can be viewed as one potential approach for safeguarding wild species. In this study were evaluated the fertility of captivity male jaguar (*Panthera onca*) and different capacitation media using the golden hamster zona free oocyte penetration assay. We used frozen/thawed semen from 3 animals housed at Bosque dos Jequitibás, Campinas/SP, to test the Percoll gradient, Swim-up and Swim-up + 1 h incubation (5% CO₂ / 38°C), considering as penetration the spermatozoa head descondensation visualized within the oocyte. The results rate was greater for Percoll (26.5%) as compared to Swim-up (8.1%) ($X_2 = 19.93$; $p < 0.05$). It was not observed penetration with Swim-up + 1 h incubation (5% CO₂ / 38°C). It is concluded that Percoll and Swim-up are efficient methods to perform the golden hamster zona free oocyte penetration assay using frozen/thawed jaguar (*Panthera onca*) spermatozoa. The low rate of penetration could be related to the high rate of morphological abnormal spermatozoa observed in the samples examined.

UNITERMS: *Panthera onca*; Semen; Criopreservation; Sperm capacitation; Trials; Penetration; Oocytes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BAVISTER, B.D.A. A consistently successful procedure for in vitro fertilization of golden hamster eggs. **Gamete Research**, v.23, n.4, p.139-58, 1989.
- 2- BLOM, E. **On the evaluation of bull semen with special reference to the employment for artificial insemination**. Copenhagen: Carl F. Mortensen, 1950. p.200-23.
- 3- BYERS, A.P.; HUNTER, A.G.; SEAL, U.S.; BINEZIK, G.A.; GRAHAM, E.F.; REINDL, N.J.; TILSON, R.L. In vitro induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the Siberian tiger (*Panthera tigris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.86, n.2, p.599-607, 1989.
- 4- CARVALHO, C.T. Sêmen em grandes felinos. **Revista de Medicina Veterinária**, v.2, n.4, p.195-201, 1968.
- 5- DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; SEAL, U.S.; ARMSTRONG, D.L.; SIMMONS, L.G.; GROSS, T.; TILSON, R.L.; WILDT, D.E. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, n.2, p.555-64, 1992.
- 6- FELDMAN, E.D.; NELSON, R.C. Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: FELDMAN, E.D.; NELSON, R.C. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1996. p.673-90.
- 7- FIRST, N.L.; PARRISH, J.J. In vitro fertilization of ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.34, p.151-65, 1987.
- 8- GANGULY, J.; RAO, M.R.S.; MURTHY, S.K.; SARADA, K. Systemic mode of action of vitamin A. **Vitamins Hormones**, v.38, p.1-5, 1980.
- 9- HOWARD, J.; BUSH, M.; WILDT, D. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. **Journal of Andrology**, v.12, n.1, p.36-45, 1991.
- 10- HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M.E. **Zoo & wild animal medicine current therapy**. 3.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1993. p.390-9.
- 11- HUANG, H.F.S.; DYRENFURTH, I.; HEMBREE, W.C. Endocrine changes associated with germ cell loss during vitamin A induced recovery of spermatogenesis. **Endocrinology**, v.112, n.4, p.1163-71, 1983.
- 12- JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDERMARK, N.L. **The Testis**. New York : Academic Press, 1970. v.3, p.170.
- 13- MELLEEN, J.D. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis* spp.): a multiple regression analysis. **Zoo Biology**, v.10, n.2, p.95-110, 1991.
- 14- MIES-FILHO, A.; TELECHEA, N.L.; BOHRER, J.L.; WALLAWER, W.P. Produção espermática de *Panthera onca*. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.2, n.1, p.55-65, 1974.
- 15- MORATO, R.G. **Reprodução em onça pintada *Panthera onca* (Linnaeus, 1758)**: avaliação do método para contenção e para obtenção de sêmen, caracterização do ejaculado, biometria testicular, níveis séricos de testosterona e sazonalidade. São Paulo, 1997. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 16- ROELKE, M.E.; MARTENSON, J.S.; O'BRIEN, S.J. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered *Florida panther*. **Current Biology**, v.3, n.6, p.340-50, 1993.
- 17- SCHELLANDER, K.; BRACKET, B.G.; KEEFER, C.L.; FAYRER-HOSKEN, A.R. Testing capacitation of bull sperm with zona-free hamster ova. **Animal Reproduction Science**, v.18, n.1-3, p.95-104, 1989.
- 18- SIDHU, K.S.; KAUR, J.; GURAYA, S.S. A preliminary of a zona-free hamster oocyte penetration test for evaluation the fertility of buffalo sperm. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTION IN DOMESTIC RUMINANTS, 4., Townsville, 1994. **Proceedings**. Townsville : s.c.p., 1994. v.1, p.57.
- 19- WILDT, D.E.; BUSH, M.; HOWARD, J.G.; O'BRIEN, S.J.; MELTZER, D.; VAN DYK, A.; EBEDES, H.; BRAND, D.J. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v.29, p.1019-25, 1983.

Recebido para publicação: 20/01/2000
Aprovado para publicação: 12/12/2000