

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONGELAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS  
PROVENIENTES DE EPIDÍDIMO DE GATOS DOMÉSTICOS  
CONTENDO ANTIOXIDANTE NO MEIO DILUIDOR**

**Beatrice Ingrid Macente  
Médica Veterinária**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONGELAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS  
PROVENIENTES DE EPIDÍDIMO DE GATOS DOMÉSTICOS  
CONTENDO ANTIOXIDANTE NO MEIO DILUIDOR**

**Beatrice Ingrid Macente**

**Orientador: Prof.Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente  
Co-orientador(a): Profa. Dra. Maricy Apparício Ferreira**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

**2014**

M141c Macente, Beatrice Ingrid  
Congelamento de células espermáticas provenientes de epidídimo  
de gatos domésticos contendo antioxidante no meio diluidor / Beatrice  
Ingrid Macente. -- Jaboticabal, 2014  
iv, 69 f. il. ; 29 cm

Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente  
Coorientadora: Maricy Apparício Ferreira  
Banca examinadora: Eliandra Antonia Pires Buttler, Juliana  
Corrêa Borges Silva  
Bibliografia

1. Antioxidante. 2. Estresse oxidativo. 3. Felino. 4. Recuperado  
epididimário I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.8





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** CONGELAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS PROVENIENTES DE EPIDÍDIMO DE GATOS DOMÉSTICOS CONTENDO ANTIOXIDANTE NO MEIO DILUIDOR

**AUTORA:** BEATRICE INGRID MACENTE


**ORIENTADOR:** Prof. Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA

Pós-Doutoranda / Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal /  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Profa. Dra. ELIANDRA ANTONIA PIRES BUTTLER

Pós-Doutoranda / Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal /  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Profa. Dra. JULIANA CORRÊA BORGES SILVA

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 27 de fevereiro de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**BEATRICE INGRID MACENTE**, filha de Donizete Aparecido Macente e Maria Imaculada da Costa Macente, nasceu na cidade de Campinas, São Paulo, em 26 de fevereiro de 1986; concluiu o ensino médio no colégio Integral – Tarsila do Amaral, na cidade de Indaiatuba, em dezembro de 2003. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina – UEL – Paraná, em março de 2005, concluindo-o em dezembro de 2009. Ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional, no setor de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Unesp, Campus Jaboticabal, em fevereiro de 2010, concluindo-o em fevereiro de 2012. Ingressou no curso de pós-graduação, ao nível de Mestrado, sob orientação do Prof<sup>o</sup> Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente e co-orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Maricy Apparício Ferreira, no Programa de Medicina Veterinária, Área de concentração em Reprodução Animal, na mesma Universidade, em março de 2012, com bolsa de mestrado Fapesp (Processo n°2011/15148-8).

**“Não aja como uma rã sentada no fundo do poço” - Provérbio chinês.**

## **AGRADECIMENTOS**

*Acima de tudo, agradeço a meu orientador, Profº Dr. Wilter R. R. Vicente e a minha Co-orientadora, Profª Dra. Maricy A. Ferreira, por toda amizade que me dedicaram.*

*A Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado durante a execução deste projeto.*

*As professoras Eliandra A. P. Buttler e Juliana C. B. Silva, pela valiosa participação da banca examinadora. A Maria Emília pela importante participação na banca de qualificação.*

*As professoras Vera e, novamente a Juliana C. B. Silva, que tanta dedicação e presteza nos guiaram em todos os processos desta dissertação, sendo de participação fundamental.*

*Aos Pós-graduandos Luciana, Paula (Paulinha), Caio, Fabiana, Ricardo, Leandro, Felipe, Reinaldo (Clínica médica) e André Galvão (Nefrologia); as Residentes Ana Paula e Marina; a graduanda Isabela; e as Pós-doutorandas Aracelle e Tathiana, por toda ajuda nas dúvidas sobre o mestrado, aulas, cirurgias, disponibilizando materiais, enfim, sendo grandes amigos.*

*A Fernanda Canello (in memoriam), um anjinho que veio a terra, cumpriu sua missão e foi embora muito cedo, nos deixando com muitas saudades!*

*Aos funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, D. Izilda, Anésia, Arnildo, Ivo, Roberta, Edson, Seu João, Marcelo e Zé Carlos, pela compreensão, paciência, companhia e amizade, durante os dias de experimento e análises laboratoriais.*

*Aos voluntários de proteção aos animais: Suely, Milena, Henrique e Renata, por terem conseguido todos os gatos que foram castrados no experimento, com muita dedicação e presteza, em meio a arranhões e miados. Vocês também foram fundamentais!!!*



*A minha amiga e “gêmea má”, companheira das melhores e piores horas da residência ao mestrado, Raquel R. Gutierrez, pelo apoio, participação, companheirismo e torcida. Vai fazer falta no doutorado!!!*

*A minha amiga Cíntia Bassoli, pelo apoio e carinho que me oferece sempre, mesmo um pouquinho distante.*

*Ao meu “namorado” Cleber Mansano e aos meus pais, irmão e familiares, que sempre me apoiaram em minhas decisões; por terem me dado carinho, confiança e motivação.*

*A Deus e São Francisco de Assis, por sempre iluminarem meu caminho*

*.....Muito Obrigada!*

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
Objetivos.....	05
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	06
2.1. Anatomo-fisiologia da Reprodução do Gato Doméstico.....	06
2.2. Colheita de células espermáticas da cauda do epidídimo e ducto deferente.....	07
2.3. Avaliação seminal.....	09
2.4. Criopreservação do sêmen de gatos domésticos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Constituição das amostras.....	19
3.3. Obtenção do recuperado espermático.....	21
3.4. Avaliação do recuperado espermático a fresco.....	21
3.5. Grupos Experimentais.....	24
3.6. Congelação.....	24
3.7. Descongelação. ....	25
3.8. Avaliação pós-congelação.....	25
3.9. Análise Estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	27
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS.....	38

## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 012007/12 do trabalho de pesquisa intitulado **"Uso de antioxidantes no meio diluente Botu-crio® para congelação de células espermáticas provenientes de epidídimo de gatos submetidos a orquiectomia eletiva"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Wílter Ricardo Russiano Vicente está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 05 de junho de 2012.

Jaboticabal, 11 de junho de 2012.

  
**Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi**  
Coordenador - CEUA

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental.....	18
Figura 2. a)Posicionamento dos gatos para o procedimento cirúrgico. b)Realização da orquiectomia. c)Armazenamento dos testículos para transporte até o laboratório. Observar a ligadura do funículo espermático para evitar a perda dos espermatozóides. d), e) e f)Posicionamento do testículo para a dissecção dissecção e individualização do ducto deferente e cauda do epidídimo. g)Compressão da cauda do epidídimo e ducto deferente por meio de uma lâmina de vidro, com derrame do material coletado em uma gota de 250 µL de Ringer Simples (seta amarela). h)Observar o recuperado espermático diluído no Ringer Simples (seta amarela).”.....	20
Figura 3. Figura 3. Fotomicrografia do campo óptico no teste de avaliação morfológica, evidenciando: a) dois espermatozóides com a cauda fortemente dobrada. b) forma teratogênica (cabeças múltiplas). Coloração: eosina amarela. Aumento de 1000x.....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características do líquido seminal das principais espécies de interesse reprodutivo na fase adulta.....	07
Tabela 2. Comparativo entre os métodos de colheita de material espermático por meio dos parâmetros seminais em gatos domésticos machos obtidos da literatura.....	08
Tabela 3. Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) obtidos nos testes de Motilidade (Mot), Vigor, Supravital (Vital), Hiposmótico (Hip) e Morfologia (Def Mai e Def Men), para o recuperado epididimário a fresco e após a congelação, para o grupo controle (G0) e as três concentrações diferentes de vitamina E (G0,3; G0,6; G0,9) Jaboticabal, 2014.....	27
Tabela 4. Porcentagens de anormalidades menores na análise morfológica dos espermatozóides obtidos da cauda de epidídimo e ducto deferente de gatos domésticos antes (fresco) e após o processo de congelação (G0/ G0,3/G0,6/G0,9). Jaboticabal, 2014.....	28
Tabela 5. Porcentagens de anormalidades maiores na análise morfológica dos espermatozóides obtidos da cauda de epidídimo e ducto deferente de gatos domésticos antes (fresco) e após o processo de congelação (G0/ G0,3/G0,6/G0,9). Jaboticabal, 2014.....	29
Tabela 6. Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) das análises de lipoperoxidação lipídica pelo teste TBARS nos quatro grupos, após a	

congelamento, demonstrando a produo (RL), a mxima produo (SG) e a poder antioxidante (Delta) de radicais livres. Jaboticabal, 2014.....	30
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA = Análise de Variância

CAT = Catalase

CUr = Cateterização uretral

cm = Centímetros

Def. mai = Defeitos Maiores

Def. men = Defeitos Menores

DNA = Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)

CFDA = Diacetato de Carboxilfluoresceína

DIC-IP = Dicarboxilfluoresceína – Iodeto de Propídio

DMSO = Dimetilsulfóxido

EE = Eletroejaculação

ROS = Espécies Reativas ao Oxigênio

Ex. = Exemplo

FIV = Fertilização *in vitro*

Fluor = Fluorescência

GSH-PX/ GSH = Glutathione Peroxidase/ Redutase

°C = Graus Celsius

g = Giros

BHT = Hidroxitolueno Butilato

NaCl = Hipoclorito de Sódio

Hip = Hiposmótico

h = Horas

FSH = Hormônio Folículo Estimulante

GnRH = Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

LH = Hormônio Luteinizante

IA = Inseminação Artificial

IUCN = International Union for Conservation of Nature (União Internacional de Conservação da Natureza)

IP = Iodeto de Propídio

Kg = Kilograma

> = Maior

≥ = Maior e/ou Igual

MDA = Malonaldeído

μL = Microlitro

μm = Micrômetros

10<sup>6</sup> = Milhões

mg = Miligrama

mL = Mililitros

mM = Milimolar

mOsm = Miliosmolar

Mot = Motilidade

nm = Nanômetro

p = Nível Descrito

N = Normalidade

% = Porcentagem

RL = Radicais Livres

SG = Solução Geradora

SOD = Superóxido Desmutase

Vital = Supravital

TBARS = Teste de Resistência ao Estresse Oxidativo

T<sub>4</sub> = Testosterona

EYT – FC = Tris-frutose-citrato-gema

VA = Vagina artificial



## CONGELAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS PROVENIENTES DE EPIDÍDIMO DE GATOS DOMÉSTICOS CONTENDO ANTIOXIDANTE NO MEIO DILUIDOR

RESUMO – Este estudo foi conduzido com o objetivo de o uso do meio diluente Botu-crio associado a vitamina E, em diferentes concentrações, que se demonstrem efetivas para a criopreservação de sêmen obtido de recuperado epididimário em felinos domésticos. Cinquenta e quatro gatos domésticos foram utilizados no experimento após serem submetidos à orquiectomia eletiva e os espermatozoides obtidos diretamente da cauda e ducto deferente do epidídimo. Foram constituídos 18 “pools”, com o material de três animais cada e estes, divididos em quatro grupos experimentais. No grupo controle (G0) o sêmen foi congelado com o diluente Botu-Crio<sup>®</sup>. Nos grupos G 0,3, G 0,6 e G 0,9, ao diluente Botu-Crio<sup>®</sup> foi acrescido vitamina E em três concentrações, 0,3, 0,6 e 0,9mM, respectivamente. Para cada grupo, as amostras de sêmen fresco foram inicialmente avaliadas quanto à motilidade, vigor, morfologia supravital e teste hiposmótico, para verificar a qualidade mínima exigida para a congelação (motilidade  $\geq 70\%$  e vigor  $\geq 3$ ). Os mesmos parâmetros foram reavaliados após a descongelação também para o TBARS. Na avaliação da motilidade e vigor, não foi observado diferença estatística entre o grupo controle e as concentrações de vitamina E. Nos testes supravital, hiposmótico, morfológico e teste TBARS, também não houve significância entre as três diferentes concentrações de vitamina E e o grupo controle. Pode-se concluir que as três concentrações de vitamina E, não ofereceram proteção antioxidante ao recuperado de epidídimo de felinos domésticos.

**Palavras chave:** antioxidante, estresse oxidativo, felino, recuperado epididimário

## **FREEZING SPERM CELLS OF EPIDIDYMIS DOMESTIC CATS WITH ANTIOXIDANT IN THE DILUENT MIDDLE**

**ABSTRACT** - This study was conducted with the objective of using the medium Botu-crio<sup>®</sup>, associated vitamin E, at different concentrations, which demonstrate effective for cryopreservation of epididymal semen obtained recovered from domestic cats. Fifty-four domestic cats were used in the experiment after undergoing elective orchiectomy and sperm obtained directly from the tail of the epididymis and vas deferens. 18 " pools " were made with the material of three animals each and these were divided into four experimental groups. In the control group (G0) semen was frozen with Botu-crio<sup>®</sup>. In the groups G 0.3, G 0.6 to G 0.9, the diluent was added at three concentrations of vitamin E, 0.3, 0.6 and 0.9 mM, respectively. For each group, the fresh semen samples were initially evaluated for motility, viability, morphology and supravital and hypoosmotic test to verify minimum quality required for freezing ( $\geq 70$  % motility and vigor  $\geq 3$ ). The same parameters were reassessed after thawing also for TBARS. In the evaluation of motility and vigor, no statistical difference was observed between the control group and the concentrations of vitamin E. In supravital tests, hyposmotic, morphological and TBARS assay, there was no significance between the different concentrations of vitamin E and the control group. It can be concluded that the three concentrations of vitamin E, antioxidant protection not offered recovered from epididymis of domestic cats.

**Keywords:** antioxidant, oxidative stress, feline, retrieved epididymal

## 1. INTRODUÇÃO

Espécies de animais selvagens estão ameaçadas de extinção, como consequência da mortalidade pela caça predatória, destruição dos seus habitats e também pelo tráfico ilegal (PRIMACK; RODRIGUES, 2000). Os carnívoros, principalmente os grandes felinos, necessitam ocupar extensas áreas para atender suas necessidades, sendo animais vulneráveis a fragmentação e degradação ambiental (SUTHERLAND, 2000). Entre estas, estão 36 espécies de felinos selvagens, como o leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*) e o Lince-ibérico (*Lynx pardinus*), segundo dados do IUCN (2009). No Brasil, as oito espécies de felinos selvagens que compõem a fauna estão em risco de extinção, tal como a onça-pintada (*Panthera onca*) (OLIVEIRA; CASSARO, 2005; IBAMA, 2014). As pesquisas relacionam a extinção destes animais a fatores como a reclusão a determinadas regiões o que dificulta as migrações para reprodução, reduzindo a variabilidade genética, com consequente queda da fertilidade, aumento da susceptibilidade às doenças e elevação da mortalidade infanto-juvenil (WILDT et al., 1995; FRANKHAM et al., 2004). Nesse sentido, a utilização da reprodução assistida como a inseminação artificial (IA) e a fertilização *in vitro* (FIV), entre outras técnicas como a criopreservação do sêmen, demonstraram ser uma excelente forma de preservação de germoplasma, além de solucionar problemas como distúrbios físicos e comportamentais dos animais que impedem a reprodução natural; ou ainda descartam a necessidade de transporte destes animais, facilitando a execução da variabilidade genética (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004).

Contudo, a manipulação de felinos selvagens e a difícil obtenção de exemplares são um dos grandes obstáculos para o desenvolvimento das pesquisas. Para tanto, o

emprego de gato doméstico, espécie longe do risco de extinção, é uma excelente opção como modelo experimental pelas facilidades de obtenção, manejo e fisiologia. Atualmente acrescenta-se ainda, o crescimento do interesse de criadores nos avanços das técnicas de reprodução assistida devido ao grande aumento do mercado pet mundial voltado para a venda de gatos domésticos, que já supera o número de cães como animais de estimação em muitos países como o Brasil; além de também servir como modelo de estudo para patologias humanas, principalmente nas pesquisas sobre teratospermia (LUVONI, 2006; PUKAZHENTHI et al., 2006).

Novas técnicas de processamento do sêmen estão sendo constantemente atualizadas, existindo grandes avanços principalmente com animais de produção. No entanto, poucos dados literários estão disponíveis para as espécies felinas, mesmo para os felinos domésticos (PUKAZHENTHI *et al.*, 2006). Nos estudos sobre criopreservação de sêmen é sabido que os danos causados no processamento e observados após a descongelação, reduzem a sua qualidade fertilizante. Este fato, somado as características específicas do sêmen felino, o qual apresenta altas taxas de teratospermia (>60% de espermatozóides defeituosos), dificulta o sucesso dos processos de biotecnologia do sêmen e reforça a necessidade de estabelecer melhores formas de processamento (PUKAZHENTHI *et al.*, 2006).

Existem alguns métodos de colheita de sêmen na espécie felina. Os mais comuns são a eletroejaculação (EE) e a vagina artificial (VA) (DOOLEY et al., 1991). Também há a possibilidade de recuperar as células espermáticas armazenadas na cauda do epidídimo e ducto deferente dos testículos retirados na orquiectomia. Recentemente, uma nova técnica foi descrita, com a obtenção de sêmen pela

cateterização uretral (CUr) depois da administração de medetomidina (ZAMBELLI et al., 2008). Todas estas técnicas são eficientes para obtenção de ejaculado e plasma seminal, tendo cada uma, vantagens e desvantagens (ZAMBELLI et al., 2008).

A obtenção diretamente da cauda do epidídimo apresenta como vantagens a possibilidade de preservação do material genético de animais submetidos à orquiectomia ou mesmo que vieram a óbito (TSUTSUI et al., 2000); e em termos de pesquisa com gatos domésticos, facilita a obtenção de material para estudo, pois podem estar associadas às castrações de rotina para controle populacional. Este sêmen pode ser facilmente empregado, pois apesar do menor volume obtido, mantém características semelhantes ao sêmen fresco após os processos de refrigeração e congelação (THUWANUT, 2010).

Independente da técnica de colheita de sêmen, os danos ocorridos durante a criopreservação podem prejudicar sua viabilidade. Para tanto, é necessária a associação de componentes ao sêmen que possam garantir a integridade dos espermatozóides. Um dos requisitos é a adição de meios diluentes com crioprotetores que garantam a nutrição das células e evitem danos morfológicos decorrentes do choque térmico e osmótico (WATSON, 2000). O diluente comercial Botu-crio<sup>®</sup>, apesar de formulado inicialmente para uso com sêmen de equinos (MELO et al., 2008), tem se demonstrado efetivo para o emprego em outras espécies, como a felina (MACENTE et al., 2012). Por se tratar de um produto comercial, proporciona o fácil manuseio, além de reduzir os custos do processamento.

Aos diluentes podem ser acrescentados vários aditivos para aumentar sua eficácia, como os antioxidantes, os quais atuam principalmente na preservação celular

espermática ao diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo (THUWANUT, 2010). Entretanto, devido à escassez de estudos com sêmen felino, não se conhece até o momento quais antioxidantes são os mais eficazes e principalmente quais as concentrações adequadas para a preservação da integridade celular e capacidade fertilizante.

## **OBJETIVOS**

**Geral:** Avaliar se diferentes concentrações de vitamina E associado a um meio diluente comercial é viável para a congelação das células espermáticas felinas.

**Específico:**

- Avaliar se a técnica de colheita de espermatozóides por ordenha da cauda de epidídimo (SAVI et al., 2014\*) será eficiente para a espécie felina.
- Avaliar se o teste hiposmótico é eficiente para avaliar os espermatozóides de gatos obtidos do epidídimo e ducto deferente.
- Determinar qual a concentração de vitamina E que adicionado ao meio Botu-crio<sup>®</sup> favorece a preservação das células espermáticas obtidas de epidídimo de gatos domésticos.

\*SAVI, P.A.P. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp – Jaboticabal). Comunicação pessoal, 2014.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Anatomo-fisiologia da Reprodução do Gato Doméstico**

#### **Anatomia**

Anatomicamente, os gatos domésticos possuem o pênis inserido na posição ventral ao escroto, voltado para trás, mas que se reverte durante a ereção para conclusão da cópula (JOHNSTON et al., 1996). A genitália masculina nos felinos pode ou não conter um osso peniano vestigial e papilas córneas recobrimdo cerca de dois terços da superfície, direcionadas a base do pênis (JOHNSTON et al., 1996; PARAGON; VAISSAIRE, 2001).

As papilas córneas estão completamente desenvolvidas apenas com a maturidade sexual (aproximadamente aos 9 meses de idade), com desenvolvimento e persistência andrógeno-dependentes, ou seja, regride o desenvolvimento em animais castrados (JOHNSTON et al., 1996; MORAES et al, 2002; SILVA et al., 2003). O papel principal destas papilas é a estimulação de mecâno-receptores presentes na vagina das fêmeas induzindo a ovulação no momento da cópula (BAKKER; BAUM, 2000).

Os testículos migram para o escroto ainda durante o desenvolvimento fetal, estando presentes ao nascimento, mas sendo palpáveis apenas as 6 a 8 semanas de vida. A espermatogênese inicia-se apenas aos 5 meses, com possível liberação de espermatozóides em ejaculados logo após este período (FELDMAN; NELSON, 1996). Na espécie felina doméstica, os testículos de animais adultos medem em média 1,5x1,0x1,0cm cada (JOHNSTON et al., 2001).



## Morfofisiologia

Pouca informação está disponível na literatura para melhor entendimento da morfofisiologia reprodutiva dos felinos, mesmo para o gato doméstico (PUKAZHENTHI et al., 2006). Na Tabela 1, estão descritos alguns dos parâmetros disponíveis quanto às características seminais dos gatos domésticos e sua comparação com outros animais de interesse reprodutivo.

Tabela 1. Características do líquido seminal das principais espécies de interesse reprodutivo na fase adulta.

Características	Gato (a)	Cão(c)	Touro (e)	Carneiro (e)	Cachaço (e)	Garanhão (e)
Volume (mL)	0,01 a 0,7	0,5 a 20	5 a 8	0,8 a 1,2	150 a 200	60-100
Concentração (10 <sup>6</sup> /mL)	96 a 5101 (b)	47,7 (d)	800 a 2000	2000 a 3000	200 a 300	150 a 300
Motilidade (%)	60 a 90	75	40 a 75	60 a 80	50 a 80	40 a 75
Morfologia normal (%)	>90 (c)	85%	65 a 95	80 a 95	70 a 90	60 a 90

(a) KUSTRITZ, 2009

(b) ZAMBELLI et al., 2008

(c) MIALOT (1988)

(d) AGUIAR et al., 1994

(e) GANER; HAFEZ, 2004

### 2.2. Colheita de células espermáticas da cauda do epidídimo e ducto deferente

O sêmen dos felinos pode ser obtido com o uso de vagina artificial ou eletroejaculador, por meio da cateterização uretral após administração de medetomidina e sondagem ou ainda diretamente do epidídimo e ducto deferente de testículos de animais castrados ou que vieram a óbito (AXNER; LINDE-FORSBERG, 2002; ZAMBELLI *et al.*, 2008). As principais diferenças entre estes métodos de colheita

referem-se ao volume e a concentração do sêmen obtido (Tabela 2). Além disso, independentemente da técnica utilizada e de sua correta execução, estes valores são considerados inferiores em comparação a outras espécies, como os bovinos e caninos (THUWANUT, 2010).

A colheita diretamente do epidídimo e ducto deferente pode ocorrer de duas formas: com a compressão dessas estruturas como uma “ordenha” ou após o fatiamento do epidídimo e centrifugação com colóide. Independente do método, a colheita diretamente do epidídimo resulta em quantidades muito pequenas, com baixas contagens de espermatozoides e baixos índices de motilidade quando comparado a outras técnicas, fato este que limita sua utilização (COCCHIA et al., 2009).

Tabela 2. Comparativo entre os métodos de colheita de material espermático por meio dos parâmetros seminais em gatos domésticos obtidos da literatura.

Parâmetro	Vagina Artificial	Eletroejaculação	Cauda do epidídimo	Cateterização uretral
Volume (mL)	0,01 a 0,12 (a)	0,019 a 0,74 (a)	*	0,0105 (a)
Concentração espermática (10 <sup>6</sup> /mL)	96 a 5101 (a)	168 a 361 (a)	5,5 a 72 (a)	1868,4 (a)
Número total de espermatozoides (10 <sup>6</sup> )	3 a 117 (a)	9 a 153 (a)	5,4 a 58,2 (b)	21 (a)
Morfologia espermática (% normais)	38,2 a >90 *** (a)		49 a 90,5 (c)	91,8 (a)
Motilidade (%)	56 a 84 (a)		50 a 80 (d)	78,1 (a)
pH	6,6 a 8,8 (a)		**	7 (a)
Osmolaridade (mOsm/Kg)	274 a 390 (a)		**	**

Esta tabela é modificada de Axné e Linde-Forsberg, 2002

\*O volume de espermatozoides da cauda de epidídimo depende do método de colheita.

\*\*Não há dados disponíveis.

\*\*\*Esta média varia entre os estudos, provavelmente devido aos diferentes métodos de fixação e leitura.

(a) Zambelli et al., 2008

(b) Cochia et al., 2009

(c) Goodrowe e Hay, 1993; Axné et al., 2004; Thuwanut et al., 2010

(d) Goodrowe e Hay, 1993; Axné et al., 2004; Kashiwasaki et al., 2005; Hermansson e Axné, 2007.

As características dos espermatozoides obtidos de epidídimo de gatos possuem padrões diferentes, quando comparado ao sêmen ejaculado como foi demonstrado na Tabela 2. Contudo, esta técnica se resalta das demais pela possibilidade de preservação de material genético dos animais castrados ou que vieram a óbito inesperadamente, sendo relatado que suas características não foram significativamente sensíveis aos processos de congelação ou pós-descongelação, quando comparado ao sêmen ejaculado (TEBET *et al.*, 2006; ZAMBELLI *et al.*, 2008).

### 2.3. Avaliação seminal

As técnicas de avaliação seminal devem permitir uma análise quantitativa e qualitativa. Os critérios mais empregados são as características morfológicas tais como: aspecto, volume, pH, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática (PLATZ *et al.*, 1976; HOWARD, 1993; WILDT *et al.*, 1993; SWANSON *et al.*, 1996).

Aspecto: fornece informações sobre glândulas acessórias e testículos (MANN; LUTWAK-MANN, 1981).

Volume e Concentração: determinam a qualidade de produção de sêmen (SALISBURY et al., 1961). São dependentes do grau de estimulação sexual, número de ejaculações sucessivas e método de colheita (WILDT et al., 1986).

pH: determina o poder tampão do ejaculado e possíveis contaminações do mesmo (ex. urina) (PLATZ; SEAGER, 1978).

Motilidade: é a porcentagem de espermatozóides em movimento progressivo, classificado de 0 a 100% (HOWARD, 1993).

Vigor: é verificada a qualidade do movimento progressivo executado pelos espermatozóides, avaliada em uma escala de 0 a 5 (HOWARD, 1993).

Morfologia: visa classificar os espermatozóides normais e as formas anormais, sendo estas divididas em defeitos menores e maiores (BLOM, 1950). O sêmen é normospermico quando encontrados valores iguais ou superiores a 60%; e teratospermicos quando inferiores a 40%. Teratospermia é achado frequente nos felinos domésticos, mas os mecanismos celulares e moleculares causadores ainda são desconhecidos (NEUBAUER et al., 2004). Amostras de sêmen obtidas do epidídimo apresentam maior porcentagem de espermatozóides com alterações morfológicas, com valores entre 36 a 54% (GOODROWE; HAY, 1993; LENGWINAT; BLOTTNER, 1994), uma vez que os espermatozóides continuam o processo de maturação ainda no epidídimo e ductos deferentes (LUVONI et al., 2003).

Entretanto, alguns autores já verificaram em pesquisas que as avaliações morfológicas previamente descritas são insatisfatórias para determinar o potencial fecundante do sêmen (GOODROWE; HAY, 1993; HOWARD, 1993; AITKEN, 2006). Sendo assim, a avaliação da capacidade fecundante deve ser feita por meio de testes

denominados funcionais: avaliação da integridade de membrana plasmática, integridade de acrossomo, entre outros (RODRÍGUEZ-MARTINÉZ, 2003). Os testes funcionais empregados neste estudo estão mais detalhados a seguir:

Teste hiposmótico: serve para avaliar a integridade funcional da membrana espermática, por meio da submissão dos espermatozóides ao estresse ocorrido ao ser colocado em uma solução com a osmolaridade menor do que a encontrada em seu interior (BITTENCOURT et al., 2005). A condição hiposmótica do meio externo ao espermatozóide promove um influxo de água pela membrana plasmática, causando a sua dilatação com conseqüente dobramento ou enrolamento do flagelo no interior da membrana (JEYENDRAN et al., 1984; OBERST et al., 2003). A ocorrência destas alterações morfológicas é desejável, pois caracterizam a integridade funcional da membrana (JEYENDRAN et al., 1984; FERREIRA et al. 2001, OBERST et al. 2003, ALVES et al.2005a, BORGES et al. 2005a,b).

Teste de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS): este teste determina a oxidação lipídica desencadeada durante a formação de um complexo entre os compostos de gordura com o ácido tiobarbitúrico. Esta união resulta em uma solução roséa que pode ser lida e quantificada por meio de um espectrofotômetro a 532-535nm (BERNHEIM et al., 1948; MELTON, 1983; IGENE et al., 1985).

#### **2.4. Criopreservação do sêmen de gatos domésticos**

A criopreservação é uma técnica de processamento de sêmen amplamente pesquisada com importantes estudos direcionados para os felinos (AXNÉR et al.,2004; LUVONI, 2006). Porém, os dados obtidos ainda demonstram uma grande dificuldade

em eliminar os efeitos causados pelo congelamento e descongelamento do sêmen, com muitos resultados variáveis e contraditórios, persistindo as buscas por um protocolo ideal para criopreservação do material genético dos felinos (LUVONI et al., 2003a, AXNÉR, 2006; HOWARD et al., 1986; HAY; GODROOWE, 1993; LUVONI et al., 2003b; TSUTSUI et al., 2003; ZAMBELLI et al., 2002).

É conceito que a criopreservação do sêmen só é efetiva se as análises do sêmen a fresco apresentem as características mínimas para congelação: motilidade de 70% e vigor igual ou superior a 3 (JOHNSTON et. al., 2001). Os protocolos utilizados para o recuperado epididimário de gatos domésticos demonstraram que após a descongelação houve queda na qualidade devida à diminuição da integridade acrossomal para valores entre 30-50% (LENGWINAT; BLOTTNER, 1994). Axner et al. (2004), demonstraram melhora destes valores nas análises pós-descongelação, quando o meio Tris gema de ovo foi suplementado com Equex STM<sup>®</sup>.

### **Botu-crio<sup>®</sup>**

Os diluidores mais empregados para o sêmen de felinos são o Tes e o Tris, usados de forma isolada com a adição de açúcares como frutose e glicose, ou associados (HAY; GOODROWE, 1993; SÁNCHEZ; TSUTSUI, 2002). Estes diluidores são acrescidos de 3 a 4 % de glicerol para o processo de congelação (HAY; GOODROWE, 1993; ZAMBELLI et al., 2002), contendo antibióticos como a penicilina e amicacina (SÁNCHEZ; TSUTSUI, 2002; LUVONI et al., 2003; TEBET, 2004).

Contudo, não há um consenso sobre o melhor meio diluidor para a criopreservação do sêmen de felinos domésticos, sendo testados ao decorrer das pesquisas, novos meios diluidores como o MP-50 (TEBET, 2004) e o Botu-crio<sup>®</sup>

(MACENTE et al., 2012); ou novos adjuvantes que venham a melhorar a eficiência da criopreservação, como o Equex<sup>®</sup> ( ZAMBELLI et al., 2010).

O meio diluente Botu-crio<sup>®</sup> foi elaborado para a espécie equina (MELO et al., 2008), sendo já comprovada sua eficácia nesta espécie. Seu uso é uma forma de reduzir os custos do procedimento e facilitar o emprego, uma vez que se trata de um produto comercial, com padrão de formulação e fabricação, aumentando a acurácia de seu desempenho. A sua eficácia pode ser devido à associação de dois crioprotetores intracelulares, o glicerol e a amida, com um extracelular, a gema de ovo, reduzindo o estresse osmótico (BALL; VO, 2001) e prevenindo a formação de cristais de gelo intracelular (AMANN; PICKETT, 1987). A associação de crioprotetores reduz os riscos do efeito tóxico do glicerol, visto que a quantidade de 8% ao diluente já foi comprovada ser tóxica em felinos (ZAMBELLI et al., 2002).

## **Vitamina E**

Várias são as etapas para os processos de congelação e descongelação do sêmen, que podem levar a danos morfofuncionais como: lesão de membrana plasmática, lesão da membrana acrossomal, ou ainda lesão ao material genético (DNA). Estes danos diminuem a função e o potencial de fertilização dos espermatozóides. Entre as causas podemos citar o choque térmico, o estresse osmótico (WATSON, 2000) e o estresse oxidativo (AGARWAL *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo, responsável pela queda de qualidade do sêmen, é caracterizado por um desequilíbrio da homeostase celular dos espermatozóides pela produção excessiva ou acúmulo das espécies reativas do oxigênio (ROS), vinculado a

falhas nos mecanismo antioxidantes naturais (AGARWAL et al., 2003). Um efeito benéfico pode ser obtido sobre as células espermáticas com um nível baixo de estresse oxidativo, mas em grande quantidade pode levar à morte celular (AITKEN et al., 1996).

Os ROS são espécies reativas do oxigênio que possuem elétrons livres e instáveis, que necessitam parrear com outros elétrons em moléculas próximas para se tornar estáveis, causando a oxidação das mesmas. Como exemplo de ROS, podemos citar os radicais superóxidos e hidroxilas (NOGUSHI; NIKI, 1999; SILVA, 2006).

Nos processos de criopreservação de sêmen, os radicais são gerados durante os processos de congelação e descongelação, sendo eles os responsáveis pela diminuição da função das células pós-descongelação (CHATTERJEE; GAGNON, 2001). O período de resfriamento antes da congelação, bem como o tempo de armazenamento pós-descongelação, são fatores importantes no desencadeamento do estresse oxidativo (THUWANUT et al., 2008).

As células espermáticas possuem em sua conformação de membrana, uma camada lipídica susceptível aos processos de peroxidação (SILVA, 2006). A reação entre os ROS e os ácidos graxos poliinsaturados é conhecida como peroxidação lipídica (AGARWAL et al., 2003). Esta reação é responsável por afetar a integridade e a permeabilidade de membrana e causar perdas irreversíveis da motilidade espermática (STOREY, 1997). Os radicais podem afetar diretamente o DNA espermático, causando lesões deletérias no genoma paterno do embrião (TREMELLEN, 2008).

A proteção das células contra os ROS ou outros radicais livres, pode ser obtida por meio da ação dos antioxidantes. Eles podem ser classificados em duas categorias, de acordo com sua função: enzimáticos e não enzimáticos (SILVA, 2006). Outra



classificação referida a eles diz respeito à suas solubilidades em água ou lipídio (PAPAS, 1999).

Os antioxidantes atuam suprimindo as reações em cadeia do ferro e o cobre; ou ainda eliminando os radicais livres liberados pelo metabolismo celular e os advindos de fontes exógenas, impedindo a peroxidação dos lipídios ou o ataque aos aminoácidos das proteínas e das bases de DNA (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Como exemplo de antioxidantes enzimáticos, podemos citar a catalase (CAT), a glutathione peroxidase/reductase (GSH-PX/GSH), superóxido dismutase (SOD) (IRVINE, 1996) e a vitamina E (SILVA, 2006). E para exemplificar os não enzimáticos, podemos citar a N-acetil-cisteína (SILVA, 2006).

Uma possibilidade de uso de antioxidante natural diz respeito à vitamina E, composto lipossolúvel presente nas membranas celulares lipoprotéicas, como nas células espermáticas. Esta vitamina está presente em oito diferentes formas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -, tocopherol/tocotrienols), sendo o  $\alpha$ -Tacoferol o mais ativo e abundante antioxidante lipossolúvel (BONI et al., 2010).

A vitamina E desempenha importantes funções como a supressão da reação de peroxidação lipídica causada pelas ROS, a regulação das funções fisiológicas das células e a interação com os fosfolipídios de membrana, aumentando a sua estabilidade (WANG; QUINN, 1999). A atuação deste antioxidante sobre os ROS ocorre sob a forma de quebra de cadeia, reduzindo o poder de lesão destes. Mas não promove a eliminação total dos radicais livres como um antioxidante de limpeza (DAD et al., 2006; CHOW, 1991; SHARMA; AGARWAL, 1996). A inibição da peroxidação lipídica ocorre

quando a vitamina E doa um  $H^+$  para os radicais  $O_2$ ,  $OH$  e  $ROO$ , neutralizando os mesmos (WANG; QUINN, 1999).

Apesar de alguns antioxidantes estarem presentes naturalmente nas células dos seres vivos, a diminuição ou o desequilíbrio entre eles e os níveis de ROS podem causar disfunções celulares e predispor a doenças (PAPAS, 1999). No âmbito da reprodução animal, estes compostos são encontrados no plasma seminal, no epidídimo e no citoplasma da peça intermediária dos espermatozóides (IRVINE, 1996). Contudo, estão presentes em concentrações insuficientes para impedir o estresse oxidativo e manter a viabilidade espermática nos processos de congelação e descongelação do sêmen (AURICH et al., 1997; STOREY, 1997). Além do fato de que, durante os processos de criopreservação de sêmen, o plasma seminal pode ser descartado (CHEN et al., 2003).

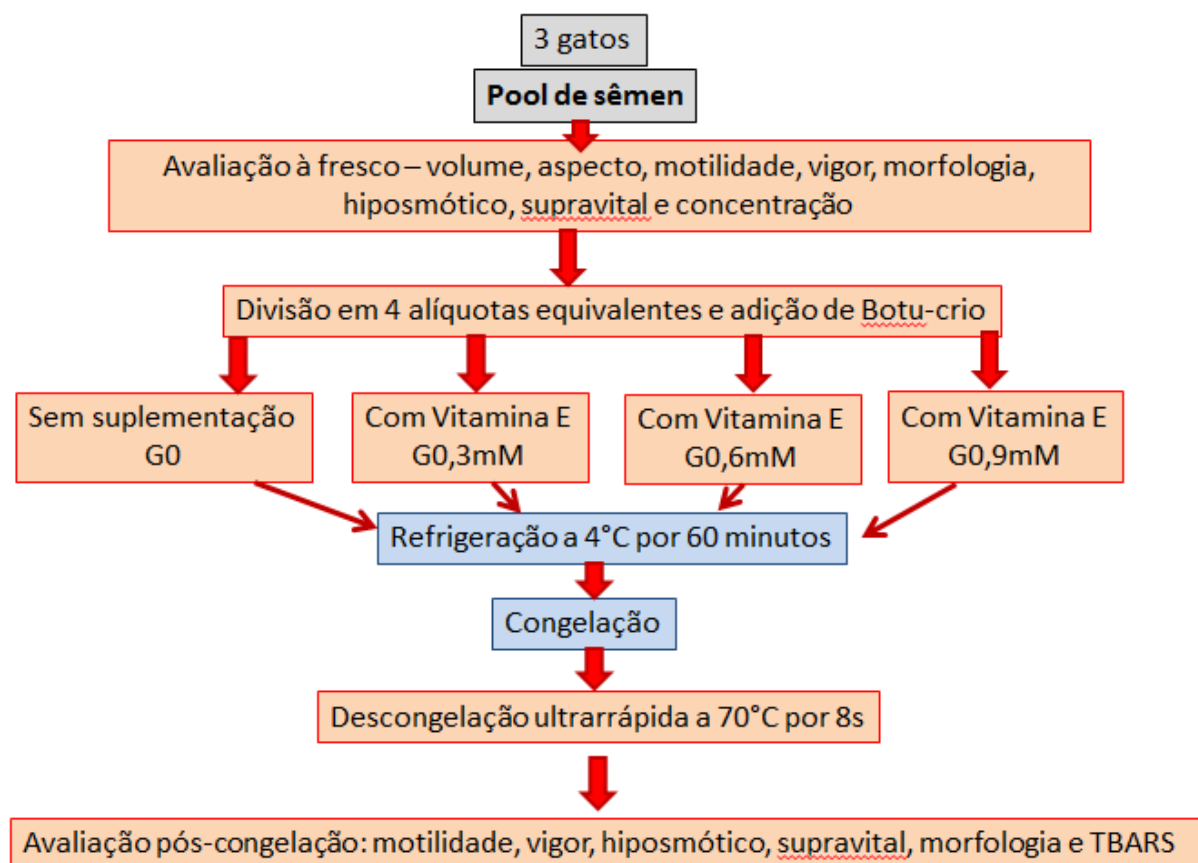
Um estudo utilizando hamsters dourados avaliou o estresse oxidativos de recuperados de epidídimo, sendo verificados maiores danos quando comparado ao sêmen, devido a este último possuir o plasma seminal produzido pelas glândulas acessórias, uma excelente fonte de antioxidantes (CHEN et al., 2003).

Muitos estudos estão sendo conduzidos com o intuito de minimizar os efeitos tóxicos dos ROS e a peroxidação lipídica dos espermatozóides, tanto em humanos como em animais, sendo que estes últimos têm servido como modelo experimental. A suplementação com medicações orais ou alimentação, formulados com antioxidantes como a GSH, cisteína, vitamina E ou vitamina C demonstrou aumentar a qualidade do sêmen pós-refrigeração ou descongelação em humanos (SULEIMAN et al., 1996), e muitas espécies animais, como os touros e cães (MICHAEL et al., 2008). Na

criopreservação de sêmen canino a adição de 0,1 mM e 0,3mM de vitamina E aumentou a viabilidade espermática pós-descongelção, mas não preservou a integridade acrossomal (MICHAEL et al., 2007; MICHAEL et al., 2009). Já na concentração de 0,6 mM, esta adição promoveu aumento da motilidade e da integridade espermática (LOPES, 2010).

No entanto, a ação dos antioxidantes na preservação da qualidade dos espermatozóides não está devidamente esclarecida, principalmente para algumas espécies como os felinos, e mais precisamente os selvagens (THUWANUT, 2010).

Em pesquisas nutricionais sobre a suplementação de vitamina E e óleo de peixe na dieta de coelhos não foi verificada eficácia sobre os parâmetros seminais (GLIOZZI et al., 2009). Em contrapartida, Thuwanut et al. (2008), avaliou a associação do Trolox, (um análogo hidrossolúvel da vitamina E) ao diluente Tris gema de ovo contendo Equex STM antes da congelação e verificaram aumento da motilidade e integridade de membrana, associado à preservação do DNA dos espermatozóides recuperados de epidídimo de gatos após a descongelção.



**Figura 1.** Fluxograma do delineamento experimental.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Os animais foram provenientes da rotina do Setor de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *campus* de Jaboticabal – Unesp. Utilizou-se 54 machos da espécie felina, submetidos a orquiectomia eletiva, sem predileção de raça, com idade superior a 8 meses ou com peso corporal hábil a reprodução (entre 2,8 – 5,4Kg) , considerados em bom estado geral, após inspeção física. As colheitas foram realizadas em épocas indeterminadas, uma vez que a literatura afirma não haver influências sazonais na qualidade espermática dos gatos domésticos (WILDT *et al.*, 1999).

#### **3.2. Constituição das amostras**

Foram constituídos 18 “pools”, compostos cada um por células espermáticas oriundas de três animais submetidos a orquiectomia eletiva no mesmo dia. Após o procedimento cirúrgico, foram realizadas ligaduras dos ductos deferentes para impedir a perda dos espermatozoides durante o transporte e em seguida, imersos em solução fisiológica NaCl 0,9% a temperatura ambiente e transportados ao laboratório de Reprodução Animal, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Campus* de Jaboticabal – Unesp, local de processamento de todas as amostras deste experimento (Figuras 2). A colheita das células espermáticas foi realizada até uma hora após a cirurgia.



**Figura 2.** a) Posicionamento dos gatos para o procedimento cirúrgico. b) Realização da orquiectomia. c) Armazenamento dos testículos para transporte até o laboratório. Observar a ligadura do funículo espermático para evitar a perda dos espermatozoides. d), e) e f) Posicionamento do testículo para a dissecação e individualização do ducto deferente e cauda do epidídimo. g) Compressão da cauda do epidídimo e ducto deferente por meio de uma lâmina de vidro, com derrame do material coletado em uma gota de 250  $\mu$ L de Ringer Simple (seta amarela). h) Observar o recuperado espermático diluído no Ringer Simple (seta amarela).

### **3.3. Obtenção do recuperado espermático**

Os espermatozoides foram obtidos por meio da técnica adaptada por Savi et al, (2014)\*. As estruturas em torno da cauda do epidídimo e ducto deferente, em cada testículo, foram dissecadas e isoladas com auxílio de uma pinça hemostática mosquito. Essas estruturas foram recostadas sobre uma placa de Petri apoiada em diagonal, para facilitar a descida do material espermático, contendo uma gota de 250µL de solução Ringer Simples (VILLAVERDE et al., 2007). Compressões do ducto deferente foram feitas com o auxílio de uma lâmina de vidro, no sentido de dispor o conteúdo sobre a gota de Ringer. Após a ordenha, o recuperado foi pipetado e colocado dentro de um tubo eppendorf de 1mL. A placa de Petri foi então lavada com mais 250µL de Ringer para evitar possíveis perdas do recuperado.

### **3.4. Avaliação do recuperado espermático a fresco**

O recuperado foi estabilizado em placa aquecedora à 38°C por 10 minutos e então se realizou a avaliação do sêmen a fresco, verificando-se o aspecto, volume, motilidade e vigor, classificando o pool em apto (motilidade  $\geq 70\%$  e vigor  $\geq 3$ ) ou não para o experimento. Uma alíquota de 5µL foi utilizada para coloração vital com eosina amarela, para avaliação posterior da vitalidade e morfologia. Outra alíquota de mesmo valor foi separada para leitura do teste hiposmótico. Em seguida, o restante deste recuperado foi centrifugado a 1.200 giros, por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Do pellet foi retirada uma amostra de 5µL e diluído na proporção de 1:20 em água destilada para determinação da concentração espermática. A descrição exata da realização de cada técnica de avaliação está descrita mais detalhadamente a seguir:

\*SAVI, P.A.P. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp – Jaboticabal). Comunicação pessoal, 2014.

### **Motilidade e Vigor**

Uma amostra de 10 $\mu$ L dos “pools” foi colocada entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C, para avaliação subjetiva sempre pelo mesmo observador, sob microscopia óptica em aumento de 10 x e 40 x. Foram avaliados: motilidade (porcentagem de células com movimento progressivo) variando de 0 a 100%; vigor (qualidade do movimento progressivo dos espermatozóides) estabelecido em escala de 0 a 5 (CBRA, 1998). Foram selecionadas as amostras com motilidade superior a 70% e vigor superior a 3.

### **Concentração espermática**

Foram determinadas as concentrações espermáticas após a centrifugação do recuperado epididimário. O sobrenadante foi desprezado e coletou-se 5 $\mu$ L do pellet que foi diluído na proporção de 1:20 em água destilada em eppendorf de 0,5mL. Após 10 minutos de estabilização em placa aquecedora a 37°C, foi feita leitura em câmara de Neubauer (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2002; STORNELLI, 2007).

### **Morfologia espermática**

Uma alíquota de 0,5 $\mu$ l do recuperado foi utilizada para averiguar morfologia espermática por meio da coloração com eosina amarela, com a confecção de esfregaços. Contou-se 200 células em microscópio óptico, com determinação das alterações morfológicas classificadas em defeitos maiores e menores (BLOM, 1950).



### **Teste supravital**

A quantificação do percentual dos espermatozóides viáveis (com integridade de membrana) foi feita após a homogeneização de uma amostra de 5  $\mu$ L do material recuperado com o corante eosina amarela e a confecção do esfregaço (SAVI et al., 2014). Foram avaliadas 200 células espermáticas, em microscópio óptico de luz, com aumento de 100 vezes. Os espermatozóides que coraram em vermelho, indicaram presença de lesões em membrana plasmática. A não impregnação do corante representou células espermáticas com membranas plasmáticas íntegras, sendo os resultados expressos em porcentagem de espermatozóides (BARTH e OKO, 1989).

### **Teste hiposmótico**

Esta avaliação seguiu a técnica escrita por Jeyendran et al. (1984), na qual os espermatozóides foram incubados em uma solução hiposmótica (150mOSM) e aquecidos a 37°C por 60 minutos. Posteriormente foram avaliados quanto a morfologia em microscópio de contraste de fase, sendo classificados em células espermáticas íntegras, as que apresentam a cauda enrolada. Foram avaliadas 200 células em cada amostra e classificadas pelo formato da cauda. Para a determinação do resultado final, foi decrescido o número de espermatozóides com cauda enrolada patológica (determinados durante a avaliação morfológica) sobrando apenas células com cauda enrolada devido ao teste hiposmótico (representando as células com membrana plasmática íntegra).

### 3.5 Grupos Experimentais

Após todas as análises no sêmen fresco, foram formados os quatro grupos experimentais com um mesmo pool. No grupo G0 (controle), foi empregado apenas o meio diluente Botu-crio<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil). Nos demais, este meio diluidor foi acrescido de vitamina E (alfa-tocoferol - T3251, Sigma), nas seguintes concentrações: grupos G 0,3, G 0,6 e G 0,9mM.

Após a avaliação da concentração foi estabelecido o número de palhetas e a quantidade de diluente a ser utilizado. É importante ressaltar que foram considerados apenas os pools que atendiam as qualidades mínimas para congelação, motilidade  $\geq 70\%$  e vigor  $\geq 3$ , bem como a quantidade mínima de palhetas necessárias para a realização de todos os testes propostos por este trabalho (oito palhetas – duas por grupo). O pellet foi então ressuspendido em 400 $\mu$ L de diluente Botu-crio<sup>®</sup> e em seguida, esse volume foi redistribuído igualmente (100 $\mu$ L) em 4 eppendorfs identificados para cada um dos grupos deste estudo. Cada um destes foi então completado com a quantidade necessária de diluente e vitamina E correspondente a concentração do grupo.

### 3.6 Congelação

Todos os grupos foram envasados em palhetas francesas de 0,25 mL, com concentração de  $5 \times 10^6$  espermatozoides por palheta, lacradas com polivinil álcool e levadas à refrigeração a 4°C, por 60 minutos. Por último, as palhetas foram transferidas para o vapor da coluna de nitrogênio líquido de 6 cm em uma caixa isotérmica preparada especificamente para este fim, por 20 minutos a -70°C. Ato contínuo, as

palhetas foram mergulhadas no nitrogênio da caixa térmica à -196°C e transferidas para armazenamento final em botijão criogênico por tempo indeterminado (TEBET, 2004).

### **3.7 Descongelamento**

A descongelamento se deu pelo método ultrarrápido, em banho-maria a 70°C, por 8 segundos (PEÑA; LINDE-FORSBERG, 2000) e mantidas em eppendorfs de 1,5 mL sobre placa aquecida a 38°C para então passarem pelas análises finais.

### **3.8. Avaliação pós-descongelamento**

As avaliações de motilidade, vigor, supravital, morfologia e teste hiposmótico foram realizadas novamente, como descritas acima, para o recuperado pós-descongelamento. Valendo-se do fato de que a integridade de membrana plasmática do espermatozoide é fator determinante para que o processo de fertilização oocitária possa ocorrer (PAPA et al., 2000), os testes descritos abaixo foram realizados para complementar a avaliação.

### **Avaliação do Índice de Resistência ao Estresse Oxidativo - TBARS**

O protocolo escolhido para realização deste teste, neste experimento, foi o descrito por Buege e Aust (1978). Foi utilizada uma alíquota de 200 µL de cada grupo após a congelamento, apresentando concentração de 5 milhões de células espermáticas cada. Foram adicionados 100 µL do recuperado descongelado em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução denominada Radical Livre (RL: 15% de ácido tricloroacético; 0,25N de ácido clorídrico, 0,375% de ácido tiobarbitúrico). Os outros 100µL foram adicionados em tubos de ensaio contendo 2 mL de uma solução denominada Sistema

Gerador (SG: idem a solução anterior acrescido de 50 mM de BHT e 0,24 mM de sulfato ferroso heptahidratado) (PAYA et al., 1992). Estes tubos foram incubados em banho fervente por 15 minutos, e em seguida, refrigerados em recipiente contendo gelo triturado por mais 15 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 1200 giros por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific – Genesy 20, China) com comprimento de onda de 532 nm. Essa leitura permitiu a determinação da peroxidação lipídica sofrida pelas células espermáticas, por meio da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a consequente avaliação da proteção antioxidante do diluidor na viabilidade espermática. Os resultados de mensuração de lipoperoxidação foram expressos em nmol de MDA/ $5 \times 10^6$  espermatozóides mediante curva padrão de MDA realizada no espectrofotômetro.

### **3.9. Análise Estatística**

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas pela aplicação dos testes de Shapiro-Wilks e Barlett.

A avaliação das diferenças das médias de qualidade seminal foi através das análises de variâncias (ANOVA) ( $p > 0,05$ ). Quando significativo, as médias foram submetidos ao teste de Duncan ( $p < 0,05$ ), o programa estatístico utilizado foi o SAS 9.2 (2008).

#### 4. RESULTADOS

Os testes de motilidade, vigor, supravital, hiposmótico e morfologia (defeitos maiores e menores), dos seguintes tempos e tratamentos: sêmen a fresco; pós-congelação, com o diluente Botu-crio<sup>®</sup> e nas três concentrações da vitamina E acrescidas ao mesmo diluente, estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) obtidos nos testes de Motilidade (Mot), Vigor, Supravital (Vital), Hiposmótico (Hip) e Morfologia (Def Mai e Def Men), para o recuperado epididimário a fresco e após a congelação, para o grupo controle (G0) e as três concentrações diferentes de vitamina E (G0,3; G0,6; G0,9) Jaboticabal, 2014.

Momento/ Grupo	Mot (%)	Vigor	Vital (%)	Hip (%)	Morfologia	
					Def Mai (%)	Def Men (%)
A fresco	75,0 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	3,55 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	74,5 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	76,7 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	12,8 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	22,5 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>
G0	15,8 $\pm$ 1,8 <sup>bc</sup>	2,50 $\pm$ 0,14 <sup>bc</sup>	38,9 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	49,3 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	26,1 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>	29,3 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>
G0,3	20,3 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	2,77 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	40,3 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	52,4 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>	22,4 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	30,5 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>
G0,6	14,7 $\pm$ 1,9 <sup>bc</sup>	2,44 $\pm$ 0,16 <sup>bc</sup>	40,0 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	45,3 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	22,6 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>	35,3 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>
G0,9	12,7 $\pm$ 1,8 <sup>c</sup>	2,11 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	38,0 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	48,5 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	25,8 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	31,5 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>
Valor-P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0048

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos na avaliação do recuperado espermático fresco foram significativamente superiores aos encontrados para os quatro grupos pesquisados após a congelação, como já era esperado.

Na avaliação da motilidade e vigor, não houve diferença estatística entre o grupo controle e as duas concentrações mais baixa de vitamina E, 0,3mM e 0,6mM. Contudo, foi possível verificar uma diferença significativa entre G0,3 e G0,9, para ambos os quesitos (20,3 e 12,7% para motilidade; 2,77 e 2,11 para vigor, respectivamente).

Para os testes supravital e hiposmótico, foi possível observar não haver significância entre as três diferentes concentrações de vitamina E e o grupo controle. A

mesma condição foi encontrada na análise morfológica comparando os grupos entre os defeitos maiores e os defeitos menores.

Nas Tabelas 4 e 5, está detalhado cada item observado na análise morfológica dos espermatozoides recolhidos da cauda do epidídimo e ducto deferente. Nesta, pode ser verificado que a maior concentração de anormalidades encontradas se concentra nas alterações de cauda, tanto em defeitos menores, quanto em maiores, entretanto, não diferiram estatisticamente (Figura 3).

Tabela 4. Porcentagens de anormalidades menores na análise morfológica dos espermatozoides obtidos da cauda de epidídimo e ducto deferente de gatos domésticos antes (fresco) e após o processo de congelação (G0/ G0,3/G0,6/G0,9). Jaboticabal, 2014.

Grupos	Anormalidades Cabeça	Alteração inserção	Anormalidades cauda	Gota cito distal	Def. Menores
fresco	3,77±0,43	0,83±0,38	9,2±1,12 <sup>b</sup>	6,94±2,06 <sup>a</sup>	20,77±2,17 <sup>b</sup>
G 0	4,05±0,67	0,83±0,27	24,3±1,55 <sup>a</sup>	0,38±0,20 <sup>b</sup>	29,61±1,67 <sup>a</sup>
G 0,3	4,05±0,46	0,94±0,21	25,1±1,78 <sup>a</sup>	0,16±0,09 <sup>b</sup>	30,22±1,77 <sup>a</sup>
G 0,6	3,61±0,57	0,33±0,14	29,4±2,20 <sup>a</sup>	2,22±2,16 <sup>b</sup>	35,61±2,96 <sup>a</sup>
G 0,6	3,33±0,60	0,50±0,18	27,3±2,59 <sup>a</sup>	0,27±0,19 <sup>b</sup>	31,38±2,54 <sup>a</sup>
Valor-P	0,8738	0,3777	0,0001	0,0020	0,0004

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

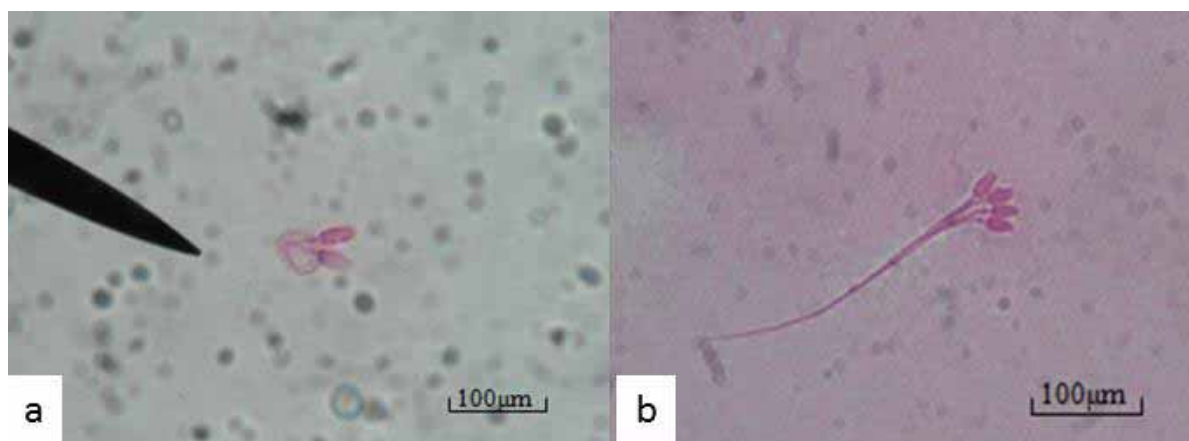
G0=grupo controle; G0,3=0,3 mM de vitamina E; G0,6mM de vitamina E; G0,9= 0,9 mM de vitamina E.

Tabela 5. Porcentagens de anormalidades maiores na análise morfológica dos espermatozóides obtidos da cauda de epidídimo e ducto deferente de gatos domésticos antes (fresco) e após o processo de congelação (G0/ G0,3/G0,6/G0,9). Jaboticabal, 2014.

Grupos	Anormalidades cabeça	Peça intermediária	Anormalidades cauda	Gota cito proximal	Formas teratogênicas	Def. Maiores
fresco	2,11±0,44	0,77±0,26 <sup>a</sup>	8,50±1,19 <sup>b</sup>	2,16±0,82 <sup>a</sup>	0,00±0,00	13,55±1,58 <sup>b</sup>
G 0	2,44±0,37	1,22±0,27 <sup>a</sup>	20,88±1,61 <sup>a</sup>	0,33±0,16 <sup>b</sup>	0,16±0,09	25,05±1,66 <sup>a</sup>
G 0,3	1,50±0,32	0,94±0,28 <sup>a</sup>	19,66±1,59 <sup>a</sup>	0,44±0,23 <sup>b</sup>	0,05±0,05	22,61±1,70 <sup>a</sup>
G 0,6	1,72±0,35	0,38±0,18 <sup>b</sup>	20,66±1,84 <sup>a</sup>	0,05±0,05 <sup>b</sup>	0,00±0,00	22,83±1,82 <sup>a</sup>
G 0,9	1,61±0,34	0,27±0,10 <sup>b</sup>	24,16±2,09 <sup>a</sup>	0,11±0,07 <sup>b</sup>	0,16±0,09	26,33±2,09 <sup>a</sup>
Valor-P	0,3551	0,0302	0,0001	0,0010	0,1310	0,0001

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

G0=grupo controle; G0,3=0,3 mM de vitamina E; G0,6mM de vitamina E; G0,9= 0,9 mM de vitamina E.



**Figura 3.** Fotomicrografia do campo óptico no teste de avaliação morfológica, evidenciando: a) dois espermatozóides com a cauda fortemente dobrada. b) forma teratogênica (cabeças múltiplas). Coloração: eosina amarela. Aumento de 1000x.

Os resultados para o índice de resistência ao estresse oxidativo, feito por meio do TBARS, estão representados a seguir (Tabela 5):

Tabela 6. Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) das análises de lipoperoxidação lipídica pelo teste TBARS nos quatro grupos, após a congelação, demonstrando a produção (RL), a máxima produção (SG) e a poder antioxidante (Delta) de radicais livres. Jaboticabal, 2014.

Tratamento	RL	SG	Delta
G0 Vit E	0,036 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,359 $\pm$ 0,026 <sup>a</sup>	0,323 $\pm$ 0,026 <sup>a</sup>
G0,3 Vit E	0,038 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,349 $\pm$ 0,027 <sup>a</sup>	0,301 $\pm$ 0,027 <sup>a</sup>
G0,6 Vit E	0,034 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,300 $\pm$ 0,022 <sup>a</sup>	0,265 $\pm$ 0,021 <sup>a</sup>
G0,9 Vit E	0,036 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,313 $\pm$ 0,026 <sup>a</sup>	0,277 $\pm$ 0,026 <sup>a</sup>
Valor-P	0,7149	0,3243	0,3492

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

G0=grupo controle; G0,3=0,3 mM de vitamina E; G0,6mM de vitamina E; G0,9= 0,9 mM de vitamina E.

As três concentrações de vitamina E usadas nos grupos, G0,3, G0,6 e G0,9, não apresentaram diferença significativa entre si e para com o grupo controle, tanto em relação a dosagem da quantidade de radicais livres produzidos pela amostra (RL), quanto no poder antioxidante das amostras (Delta) (obtido pela diferença entre a quantidade de RL e o máximo de radicais livres possíveis de ser produzido pela mesma amostra (SG)).



## 5. DISCUSSÃO

A criopreservação do sêmen de felinos, assim como para outras espécies, possui como vantagens a preservação, o deslocamento e a repetibilidade de emprego do material genético presente nas células espermáticas (VILLAVERDE, 2006).

Na busca por melhorias nas técnicas de criopreservação, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas a cerca dos diluentes, na tentativa de se obter adequada nutrição e proteção às células espermáticas, de acordo com as necessidades de cada espécie (WATSON, 2000). Como adjuvantes a estes diluentes, o emprego de antioxidantes também visa melhorias na criopreservação, reduzindo o choque térmico, o estresse osmótico e oxidativo (WATSON, 2000; AITKEN; KRAUSZ, 2001).

A recuperação de espermatozóides da cauda de epidídimo possibilita o aproveitamento do material genético de animais submetidos à orquiectomia ou que vieram a óbito (TSUTSUI et al., 2000). Ademais, nas pesquisas de criopreservação com felinos domésticos, facilita a obtenção dos espermatozóides, uma vez que esta espécie requer treinamento e adaptação para que seja possível colher o sêmen por meio de vagina artificial (JOHNSTON et al., 2001). Contudo, ainda não foram estabelecidos padrões ótimos e protocolos adequados para a criopreservação desta espécie (LUVONI, 2006; PUKAZHENTHI et al., 2006).

As análises do sêmen a fresco confirmaram a qualidade do recuperado epididimário, uma vez que foram selecionados para o experimento apenas os pools que apresentaram condições mínimas para a congelação (motilidade  $\geq 70\%$  e vigor  $\geq 3$ ). Os valores médios, encontrados no presente estudo, para o sêmen fresco em relação aos parâmetros motilidade e vigor foram de 75% e 3,5, respectivamente, semelhantes aos

encontrados por Macente et al. (2012; 72,5%) e superiores aos de Axner et al. (2004; 59%). Este fato pode ser explicado pela diferença no modo de obtenção das amostras, visto que no presente estudo e no Macente et al. (2012) utilizou-se Ringer simples e o método de ordenha por compressão da cauda do epidídimo e ducto deferente, enquanto que no de Axner et al. (2004) os espermatozoides foram recuperados após imersão da cauda do epidídimo e ducto deferente em PBS Dulbecco com posterior centrifugação. Estudos indicam que a centrifugação apresenta efeito deletério sobre a motilidade espermática e, neste quesito, o método empregado neste trabalho causou menos danos ao espermatozoide, podendo, portanto, ser considerado uma alternativa viável para a obtenção de espermatozoides com motilidade mais alta (PAPA et al., 2000).

Quando os valores da motilidade do sêmen a fresco são comparados aos obtidos após a congelação, nota-se o já esperado: uma redução deste parâmetro em decorrência dos danos causados pelo processo de congelação/descongelação, mesmo suplementado com um antioxidante. Foi observado que a adição da vitamina E nas três concentrações empregadas neste estudo não exerceu o efeito de proteção esperado, visto que os valores da motilidade e vigor não diferiram entre os grupos suplementados e o grupo controle (que possuía apenas o diluente Botu-crio<sup>®</sup>). Ademais, apesar dos valores encontrados terem sido semelhantes aos relatados por Macente et al (2012; 23,7% e 2,4 em relação à motilidade e vigor, respectivamente), foram inferiores ao relatado por Thuwanut et al. (2008), que obteve 69,4%, ao suplementar o meio Tris com 5mM de um análogo da vitamina E solúvel em água, o Trolox. Estas diferenças podem

ser atribuídas aos diferentes meios utilizados (Tris x Botu-crio<sup>®</sup>) e às isoformas de vitamina E.

Em relação ao teste supravital, notou-se que o recuperado a fresco apresentou 74,5% de espermatozóides viáveis, valor semelhante ao encontrado por Cocchia (2009; 74,3%), que comparou espermatozóides obtidos do epidídimo de gatos domésticos com os de dois Tigres de Bengala (*Panthera tigris*). Na avaliação pós-descongelção, foi observada uma redução significativa na viabilidade espermática em todos os grupos e, como não diferiram estatisticamente entre si, podemos inferir que a adição da vitamina E nestas concentrações foi insuficiente para proteger os espermatozoides contra os danos causados pela criopreservação. De forma similar, os valores obtidos no teste hiposmótico pós-descongelção não diferiram entre os grupos e ficaram aquém do sêmen a fresco, como observado em outras espécies (BITTENCOURT et al., 2005; TERRACIANO et al., 2008). Esta é a primeira vez que este teste é utilizado na espécie felina e, portanto, não foram encontrados dados na literatura para comparação. Entretanto, como os resultados foram semelhantes aos do teste supravital, constatamos ser um método válido para avaliar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides felinos.

A análise morfológica do sêmen a fresco determinou 12,8% e 22,5% para os Defeitos Maiores e Defeitos Menores, respectivamente. Estes valores foram bem aquém dos encontrados por Macente et al. (2012) ao trabalhar com recuperado de epidídimo de gatos domésticos corados com eosina-nigrosina, no qual 82,6% dos espermatozóides apresentaram defeitos maiores e 77,5% defeitos menores. Após a congelação, notou-se aumento dos defeitos maiores e menores, independente do grupo

experimental. Esta redução já era esperada, uma vez que os processos de criopreservação causam muitas injúrias aos espermatozoides (LUVONI, 2004), entretanto, acreditávamos que os grupos com vitamina E sofressem menos os efeitos dos ROS, fato não confirmado nesta pesquisa.

A avaliação do TBARS reflete o índice de estresse oxidativo ao qual o espermatozóide foi exposto durante o processo de congelação (BUEGE; AUST, 1978). Os resultados obtidos neste teste, também demonstraram não haver diferença estatística entre o grupo controle e as três concentrações de vitamina E. Uma possibilidade para este fato ter ocorrido pode ser a atuação da vitamina E, que ao interferir na cadeia dos ROS por meio da doação de íons hidrogênio, ofereceu proteção aos componentes de membrana, mas não eliminou os radicais livres diretamente como um antioxidante de limpeza (DAD et al., 2006; CHOW, 1991; SHARMA; AGARWAL, 1996). Este fato pode ter interferido na determinação do seu desempenho pelo teste TBARS. Outra possibilidade é que as concentrações de vitamina E pesquisadas neste estudo foram insuficientes para promover a devida redução na ação de radicais livres, uma vez que, observando os valores obtidos, apenas numericamente, a menor concentração de vitamina E (0,3mM) apresenta uma maior relevância as demais (BREININGER et al., 2005).

Muitos estudos com mamíferos (coelhos, equinos, bovinos, javali e carneiro) pesquisando a atuação da vitamina E na qualidade do sêmen obtiveram resultados conflitantes (HATAMOTO et al., 2005; BAUMBER et al., 2002). A suplementação de vitamina E ao meio Tris-gema-Equex, melhorou a motilidade progressiva, integridade de membrana e proteção ao DNA em sêmen epididimário de gatos domésticos após a

descongelamento, mas não foi verificado nenhum efeito protetor na integridade de membrana acrossomal (THUWANUT et al., 2008). Também não foram verificados efeitos benéficos quando da adição de catalase e superóxido dismutase ao meio Tris-frutose-citrato-gema (EYT-FC), sobre a motilidade, viabilidade e integridade acrossomal de sêmen de gatos após a descongelamento (THIANGTUM et al., 2009).

Michael et al. (2007) pesquisaram o uso de vitamina E, também na concentração de 0,3mM, no processo de congelamento de sêmen de cães no meio Tris e Tris-Equex STM, sem resultados satisfatórios. Contudo, LOPES (2010) obteve melhoras nos índices de motilidade e preservação da membrana acrossomal pós-descongelamento, ao empregar a vitamina E na concentração de 0,6mM, adicionada ao meio Tris-gema de ovo/ glicerol. Estes resultados discrepantes ratificam a necessidade de se testar outras concentrações de vitamina E e/ou outros tipos de antioxidantes na tentativa de reduzir consideravelmente os efeitos nocivos dos ROS sobre os espermatozoides criopreservados.

A indiferença observada nos testes entre as três quantidades de vitamina E e o grupo controle demonstram que as concentrações empregadas neste estudo são insatisfatórias para a proteção antioxidante do recuperado epididimário de felinos domésticos.

O que pode ser definido neste estudo, é que as quantidades empregadas estão próximas aos valores ideais, uma vez que em praticamente todos os testes não houve diferença estatística entre as concentrações e o grupo controle, não sendo evidentes efeitos tóxicos sobre os espermatozoides.

A realização de mais testes como a avaliação da integridade de membrana acrossomal e análise da atividade mitocondrial, é uma alternativa de ampliar as análises da eficácia da vitamina E, uma vez que alguns estudos já comprovaram a sua atuação diferenciada entre as partes componentes dos espermatozoides.

## 6. CONCLUSÃO

- Os resultados satisfatórios obtidos com o recuperado espermático para o sêmen fresco, reafirmam a qualidade da técnica. O método de ordenha empregado neste estudo garantiu a manutenção da qualidade espermática, abrindo caminho para novas pesquisas e discussões sobre a centrifugação nas técnicas de criopreservação seminal.
- O teste hiposmótico foi eficiente para avaliação dos espermatozóides tanto a fresco quanto após o congelamento, tendo apresentado resultados semelhantes ao teste supravital.
- A adição das concentrações de Vitamina E (0,3; 0,6; 0,9) não foram suficientes para melhorar a viabilidade das células espermáticas criopreservadas. Tais concentrações embora não tenham diferido do controle também não apresentaram proteção antioxidante.
- Portanto, sugere-se a realização de mais pesquisas sobre a criopreservação e uso de antioxidantes para o recuperado espermático de epidídimo de gatos domésticos, de modo a obter os melhores protocolos para a preservação do material genético desta espécie.

## 6-REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; PARABAKARAN, S.; ALLAMANENI, S. What an Andrologist/ urologist should know about free radicals and why. **Urology**, v.67, p.2-8, 2006.

AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil Steril**, v.79, n.4, p.829-43, 2003.

AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urology Clinic North American**, v.29, p.817-827, 2002.

AGUIAR, P.H.P.; COSTA, M.E.L.T.; ABREU, J.J.; ABREU, C.P. Coleta e avaliação de sêmen canino. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p.537-544, 1994.

AITKEN, R.J.; WINGATE, J.K.; DE LULIIS, G.N.; McLAUGHLIN, E.A. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, v.13, n.4, p.203-11, 2007.

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**. v. 122, n.4, p. 497-506, 2001.

ALVES, S.G.G.; RIBEIRO FILHO, A.L.; SNOECK, P.P.N.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, R.F.; PORTELA, A.P.M.; ALMEIDA, A.K.; MELO, M.I.V.; HENRY, M. Efeito da solução, da fixação, em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para sêmen equino congelado. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p.219-225, 2005.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.143-73, 1987.

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



AXNER, E.; HERMANSSON, U.; LINDE-FORSBERG, C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.84, n.1-2, p.179-91, 2004.

AXNER, E.; LINDE-FORSBERG, C. Sêmen collection and assessment, and artificial insemination in the cat: an update. **Recent Advances in Small Animal Reproduction: International Veterinary Information Service**, 2002. Disponível em: <[http://www.uesc.br/cursos/pos\\_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2011/paola\\_artigo1\\_semen.pdf](http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2011/paola_artigo1_semen.pdf)>. Acesso em: 01 fev. 2014.

AXNÉR, E. Sperm maturation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, p. 14-24, 2006.

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 Andrology**, v.22, n.6, p.1061-9, 2001.

BAKKER, J.; BAUM, M. J. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.21, p.220-260, 2000.

BAPTISTA SOBRINHO, C.A. **Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozoides criopreservados de cães**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – São Paulo.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. **Theriogenology**, v.58, p.301-302, 2002.

BERNHEIM, F. M.; BERNHEIM, L. C.; WILBUR, K. M. The reaction between thiobarbituric acid on the oxidation products of certain lipids. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 174, p. 257264, 1948.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. A., Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, 1999.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; LEANDRO, E.E.S.; GUIMARÃES, J.D.

Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p.213-218, 2005.

BONI, A.; PUGLIESE, C.; CHIANTELLI, C.; PATIN, R.P, OLIVEIRA, F.L.; Vitaminas antioxidantes e prevenção da arteriosclerose na infância. **Revista Paulista de Pediatria**, v.28, n.4, p.373-380, 2010.

BORGES, G.S.; FREITAS, D.S.; SILVA, A.A.B.; BISCARDE, C.E.A.; SANTANA, R.C.M.; SNOECK, P.P.N. Protocolos com água destilada para avaliar a integridade funcional de espermatozóides equino criopreservados. **Anais do 9º Seminário de Iniciação Científica, 7ª Semana de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus**, 2005a. p.94-95.

BORGES, G.S.; SNOECK, P.P.N.; ALMEIDA, A.K.; ALVES, S.G.G.; BITTENCOURT, R.F.; PORTELA, A.P.M.; MELO, M.I.V. Efeito da adição de diferentes proporções de água destilada em sêmen para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática de espermatozóides equino criopreservados. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiânia**, 2005b. 1CDRoom.

BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology** v.63, p. 2126–2135, 2005.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal Lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v.52, p. 302-310, 1978.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico avaliação de sêmen animal**. 2ed, Belo Horizonte, CBRA, 1998. 50p.

CHATDARONG, K.; BOONYEN, T.; RUNGSUK, C.; CHOWTRAKUL, C.; LOHACHIT, C. Freezing of cat epididymal spermatozoa after cool storage. In: SYMPOSIUM OF THE ASIAN ZOO AND WILDLIFE PATHOLOGY, 2., 2006, Bangkok. **Proceedings...** Bangkok, 2006 p.20.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by sperm undergoing cooling, freezing, and thawing. **Molecular Reproduction and Development**. v.59, p.451-8, 2001.

CHEN, H.; CHOW, P.H.; CHENG, S.K.; CHEUNG, A.L.; CHENG, L.Y.WS O. Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. **Journal Andrology**, v.24, p.704-711, 2003.

CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radicals Biology Medicine**, v.11, p.215-232, 1991.

COCCHIA, N.; CIANI, F.; EL-RASS, R.; RUSSO, M.; BORZACCHIELLO, G.; ESPOSITO, V.; MONTAGNARO, S.; AVALLONE, L.; TORTORA, G.; LORIZIO, R. (2009). Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. **Zygote**, v.18, n.1, p.1-8, 2009.

CUNHA, I.C.N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicinagema**. Botucatu, 1997. 124p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

DAD S.; BISBY, R.H.; CLARK, I.P.; PARKER, A.W. Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. **Free Radicals Research**, v.40, n.3, p.333-338, 2006.

DOOLEY, M.P.; PINEDA, M.H.; HOPPER, J.G.; HSU, W.H. Retrograde flow of spermatozoa into urinary bladder of cat during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. **American Journal Veterinary Research**, v.52, p.687-691, 1991.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. 487p.

FERREIRA, G.M.B.C.; SOUSA, J.P.F.; BARBAS, J.P.; HORTA, A.E.W. Teste de endosmose (HOST) em sêmen de caprinos da raça serrana. **Anais do III Congresso Ibérico de Reprodução Animal**, Porto, 2001. p.559-564.

FRANÇA, L.R.; GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1554-1561, 2003.

FRANKHAN, R.; BALLOU, J D.; BRISCOE, D.A. **Conservation Genetics**. Cambridge

University Press: Cambridge UK, 2004 , 617p.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Cap.7, 7 ed. Editora Manole: Barueri, São Paulo. 2004. P.97-110.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

GLIOZZI, T. M.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; LUZI, F.; MAERTENS, L.; CEROLINI, S. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA na vitamin E rich diets. **Theriogenology**, v. 71, p.910-919, 2009.

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

HATAMOTO, L.K.; SOBRINHO, B.C.A.; NICHI, M.; BARNABE, V.H; BARNABE, R.C.; CORTADA, C.N.M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v.66, p.1610-1644, 2006.

HAY, M.A., GOODROWE, K.L. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. **Journal Reproduction and Fertility**., v. 47, 297-305, 1993.

HERMANSSON, U.; AXNÉR, 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, p.1239–1248, 2007.

HOWARD, J.G. Semen collection and análise in carnivore. In: FLOWER, M. E. **Zoo Wild Animal Medicine and Current Therapy**. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 390-399, 1993.

IGENE, J. O. et al. Evaluation of 2thiobarbituric acid reactive substances in relation to warmed over flavour development in cooked chicken. **Journal of Agriculture and Food**

**Chemistry**, v. 33, p. 364-367, 1985.

IRVINE, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Review Reproduction**, v.1, n.1, p.6-12, 1996.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). (2003). **Lista oficial da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Disponível em: [www.ibama.gov.br](http://www.ibama.gov.br). Acesso em 25 de janeiro de 2014.

International Union for Nature Conservation (IUCN). (2009). **Status survey and conservation action plan wild cats**. Cambridge: IUCN/SSC Cat Special Group.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Veterinary Zootechiny**, v.17, n.39, p.1-8, 2002.

JEYEDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.70, n.1, p.219-228, 1984.

JOHNSTON, S. D; ROOT, M. V; OLSON, P.N.S. Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p.261-274, 1996.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OSLOM, P.N.S. Semen collection, evaluation and preservation. In: JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OSLOM, P.N.S. **Canine and Feline Theriogenology**. 1ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2001. p.287-306.

KASHIWAZAKI, N.; YAMAGUCHI, R.; UESUGI, R.; HISHIYAMA, N.; KIM, M.; NAKATSUKASA, E.; KOJIMA, Y.; OKUDA, Y.; HISAMATSU, S.; INOMATA, T.; SHINO, M. Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. **Journal of Reproduction Development**, v. 51, p.735–9, 2005.

KUSTRITZ, M.V.R. **Clinical Canine and Feline Reproduction: Evidence-Based Answers**. Willey-Blackwell, 2009.p. 134-139.

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, p.291-301, 1994.

LOPES, B.V. **Efeito da adição e/ou suplementação de antioxidante no processo de congelação/descongelação de sêmen de cães férteis e subférteis**. 2010. 113f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LUVONI, G.C.; KALCHSCHMIDT, E.; LEONI, S.; RUGGIERO, C. Conservation of feline semen. Part I: cooling and freezing protocols. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, p. 1-6, 2003.

LUVONI, G.C.; KALCHSCHMIDT, E.; MARINONI, G. Conservation of feline semen. Part II: Cold-induced damages on spermatozoal fertilizing ability. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 5, p. 257-263, 2003.

LUVONI, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v.66, n.1, p.101-11, 2006.

MACENTE, B.I.; MANSANO, C.F.M.; PEREIRA, M.M.; MARTINS, M.I.M.; GIOSO, M.M.; SAVI, P.A.P.; GUTIERREZ, R.R Congelação de espermatozóides epididimário de gatos utilizando o diluidor Botu-crio após refrigeração por 24hs em contêiner de transporte de sêmen Botu-tainer. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.2, p.112-117, 2012.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen. **Berlin, Springer-Verlag**, 1981. 495p.

MELO, C.M.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Como colher e congelar sêmen de epidídimo de reprodutores terminais ou mortos. In: CONFERÊNCIA ANUAL ABRAVEQ, 9., 2008, São Paulo. **Anais...**, São Paulo: ABRAVEQ, 2008.

MELTON, S. L. Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. **Food Technology**, v. 37, p. 105-116, 1983.

MIALOT, J. P. **Patologia da Reprodução dos carnívoros domésticos**. Porto Alegre: Metrópole, 1988. 160p.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; BOSCOS, C. Effect of antioxidant supplementation on sêmen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.68, p. 204-212, 2007.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCOS, C.M. Effect of N-acetyl-L19 cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, v.10, n.1111/j. p.1439-0531, 2008.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCOS, C. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.112, p. 119-135, 2009.

MORAIS, R.N.; MUCIOLO, 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. weidii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p. 2027-2041, 2002.

MOURA, T.C.M.; SILVA, S.V.; ARRUDA, L.C.P.; SOUZA, H.M.; SILVA, E.C.B.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. Uso de antioxidantes não enzimáticos na criopreservação de sêmen caprino. **XIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX 2013 – UFRPE: Recife, 09 a 13 de dezembro.**

NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; BLOTTNER, S. et al. Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Biology of reproduction**, v. 71, n.5, p. 1517-1524, 2004.

NOGUSHI, N.; NIKI, E. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: **Antioxidant status, Diet, Nutrition, and Health** (edited by Papas, A.M.). Washington: CRC Press, 1999. p. 3-19.

OBERST, E.R.; JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C.; KROTH, E.; LARA, G.; SMIDERLE, W.; BRONZATTO, M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos da avaliação da

integridade da membrana espermática de carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p. 375-376, 2003.

OLIVEIRA, T.G.; CASSARO, K. **Guia de campo dos felinos do Brasil**. São Paulo: Instituto pró - carnívoros, Fundação parque zoológico de São Paulo, Sociedade de zoológicos do Brasil, Pró vida Brasil, 2005. 80 p.

PAPA, F.O.; GABALDI, S.H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.24, p.39-44, 2000.

PAPAS, A.M. Determinants of antioxidant status in humans. In: **Antioxidant status, Diet, Nutrition, and Health** (edited by Papas, A.M.). Washington: CRC Press, 1999.p. 24-30.

PARAGON, B.M.; VAISSAIRE, J.P. **Enciclopédia do gato-Royal Canin**. Paris: aniwasa Publishing, 2001, p.443.

PAYA, M.; HALLIWEL, B.; HOULT, J.R. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p. 205-214, 1992.

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

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of equex, one or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-75, 2000.

PLATZ, C.C.; FOLLIS, T.; DEMOREST, N.; SEAGER, S.W.J. Semen collection, freezing and insemination in the domestic cat. **Proceedings** of VIII International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Cracow, p.1053–1056, 1976.

PLATZ, C.C.; SEAGER, S.W.J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **JAVMA** 173, p.1353-1355, 1978.



PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Midiograf, 2001.

PUKAZHENTI, B.S.; NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; HOWARD, J.; WILDT, D.E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. **Theriogenology**, v.66, n.1, p.112-21, 2006.

PUKAZHENTI, B.; WILDT, D.E. Which reproduction technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife?. **Reproduction of Fertility Development**, v.16, p.33-46, 2004.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction Domestic Animal**, v.38, p. 312-318, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. In: CHENOWETH, P.J. **Topics in bull fertility**, 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acesso em: 02 fev. 2014.

SALISBURY, G.W.; VanDEMARK; LODGE, J.R. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. San Francisco, **W.H. Freeman**, 1961. 639p.

SÁNCHEZ, A.; TSUTSUI, T. Evaluación de dos diluyentes seminales para preservación refrigerada de espermatozoides de gato (*Felis catus*). Nova técnica. **Revista Científica De la Facultad de Ciencias Veterinarias de Zulia**, v. 4, p. 249-253, 2002.

SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v.48, p. 835–50, 1996.

SILVA, T.F.P. Reprodução de Felídeos. In: IV CICLO DE ATUALIZAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2003, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza, 2003. p.34-39.

SILVA, P.F.N. **Physiology of peroxidation process in mammalian sperm**. 2006. PhD thesis - Utrech University, Ridderprint.

SILVEIRA, L. **Ecologia comparada e conservação da onça pintada (*Panthera onca*) e onça parda (*Puma concolor*), no cerrado e pantanal**. 2004. Dissertação de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasil, 2004.

SOUZA, F.F. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. Botucatu, 2003, 97p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista.

SPINDLER, R.E.; WILDT, D.E. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, n.61, p. 188-194, 1999.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM SAS Institute. **SAS/STAT 9.2 User's guide**. SAS Institute Inc, Cary, NC. 2008.

STORNELLI, M. A. Evaluación de semen en el gato doméstico: análisis de rutina y metodologías especiales felino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p. 135-140, 2007.

STORNELLI, M. C.; STORNELLI, M. A. **Evaluación, Criopreservacion de Semen e Inseminacion Artificial en el Gato Doméstico**. Asociación Argentina de Medicina Felina, Buenos Aires, 2001. Disponível em: < <http://www.aamefe.org.ar/>>. – Acesso em: 21 jan. 2014.

STOREY BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.203-13, 1997.

SUTHERLAND, W.J. 2000. **The conservation handbook: research, management, and policy**. United Kingdom: Blackwell Science. 278p.

SULEIMAN, S.A.; ALI, M.E.; ZAKI, Z.M.; EL-MALIK, E.M.; NASR, M.A. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal Andrology**, v.17, n.5, p.530-7, 1996.

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**, p. 87-94, 1996.

TEBET, J. M. **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, 115 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista), Botucatu, 2004.

TEBET, J.M.; MARTINS, M.I., CHIRINEA, V.H.; SOUZA, F.F.; CAMPAGNOL, D.; LOPES, M.D. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, n.6-7, p.1629-32, 2006.

TERRACIANO, P.B.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; MIQUELITO, L.V.; ARLAS, T.R.; CASTRO, F.; MATTOS, R.C.; PASSOS, E.P.; OBERST, E.R.; LIMA, E.O.C.L. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1972-1977, out, 2008.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; TECHAKUMPHU, M.; AXNER, E. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity, and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Theriogenology**, v.70, p.233-240, 2008.

THUWANUT, P. **Role of oxidative stress and antioxidants in domestic and non-domestic cat spermatozoa**. 2010. Doctoral Thesis - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

THIANGTUM, K.; PINYOPUMMIN, A.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Effect of catalase and superoxide dismutase on motility, viability and acrosomal integrity of frozen-thawed cat spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, p.369–372, 2009.

TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; STORNELLI, M.A.; STORNELLI, M. C.; DESMARÁS, E.; DE LA SOTA, R. L. Concentración y viabilidad de espermatozoides epididimales felinos em diferentes épocas del año. In: Reunión Interamericana de Cátedras de Fisiología Animal, 7, 2004, Santa Rosa, La Pampa, Argentina. **Libro de resúmenes** ... Santa Rosa: Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, 2004. p106.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v.14, p.243-258, 2008.

TSUTSUI, T.; TANAKA, A.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; MURAI, M. Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. **Journal Veterinary Medical Science**, v.62, p.1241-1245, 2000.

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.

VILLAVERDE, A.I.S.B.; LOPES, M.D. Inseminação Artificial em gatos domésticos utilizando sêmen criopreservado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.31, p.77-83, 2007.

WANG, X.; QUINN, P.J. Vitamin E and its functions in membranes. **Progress in Lipid Research**, v.38, p.309-36, 1999.

WATSON, P.F., The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.481-92, 2000.

WILDT, D.E.; HOWARD, J.G.; CHAKRABORTY, P.K.; BUSH, M. Reproductive physiology of the clouded leopard: A circannual analysis of adrenal-pituitary-testicular relationships during electroejaculation or after an adrenocorticotropin hormones challenge. **Biology of Reproduction**, v.34, n.5, p.949-59, 1986.

WILDT, D.E.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; BARONE, M.A.; COOPER, K.A.; GRISHAM, J.; HOWARD, J.G. Reproductive status of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in north american zoos: the benefits of physiological surveys for strategic planning. **Zoo Biology**, v.12, p.45-80, 1993.

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

WILDT, D.E.; BROWN, J.L.; SWANSON, W.F. Cats. In: **Encyclopedia of Reproduction** (eds E. Knobil e J. Neill). New York: Academic Press., 1999. p. 497-510.

ZAMBELLI, D.; CANEPPELE, B.; CASTAGNETTI, C.; BELLUZZI, S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. **Reproduction Domestic Animal**. v.37, p.1–4, 2002.

ZAMBELLI, D.; PRATI, F.; CUNTO, M.; IACONO, E.; MERLO, B. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. **Theriogenology**, v.69, n.4, p.485-90, 2008.

ZAMBELLI, D.; IACONO, E.; RACCAGNI, R.; MERLO, B. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. **Theriogenology**, v.73, p.886–892, 2010.

ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. Botucatu, 1998. 121p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

