

## **DESAFIOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA DA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN FELINO**

(Challenges for the development of feline semen cryopreservation technology)

**Ticiano Franco Pereira da SILVA<sup>1\*</sup>, Camila Louise ACKERMANN<sup>2</sup>, Lúcia Daniel  
Machado da SILVA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Faculdade de Veterinária- Universidade Estadual do Ceará (UECE)- Fortaleza, CE; <sup>2</sup>Laboratório de Biotécnicas da Reprodução, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP)- Botucatu- SP

\*E-mail: ticifranco@hotmail.com

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho é levantar os pontos mais importantes que podem comprometer o resultado final do procedimento de criopreservação seminal em felinos.

Palavras-chave: esperma, gatos, criopreservação seminal.

### **ABSTRACT**

The aim of this work is to raise the most important points that can affect the outcome of semen cryopreservation procedure in cats.

Key words: sperm, cats, semen cryopreservation.

### **INTRODUÇÃO**

A criação doméstica de gatos vem se expandindo e, em muitos países e nas maiores capitais do mundo, o número de gatos já superou o de cães. No Brasil, espera-

se que em 2020, a população felina igualar-se-á à canina (Souza, 2000). Atribui-se a esta expansão mundial, o fato dos gatos necessitarem de menor espaço e menos cuidados do que os requeridos pelos cães (Corrada e Gobello, 2000). O aumento da criação alavanca um mercado de produtos e serviços especializados, além de criar uma demanda por biotecnologias, em especial as reprodutivas, já que muitos criam não só por *hobby*, mas também como uma atividade comercial. Isto gera a necessidade dos criadores em potencializar a capacidade reprodutiva de seus animais. Percebe-se uma demanda dos criadores comerciais de gatos domésticos pelos serviços de avaliação andrológica e inseminação artificial (IA) (Stornelli e Stornelli, 2001).

Os gatos ainda possuem importante papel como modelo experimental, permitindo o aperfeiçoamento do conhecimento dos processos biológicos e reprodutivos a serem aplicados aos felídeos selvagens (Luvoni et al., 2003). Assim, protocolos de criopreservação de sêmen podem ser inicialmente testados em gatos domésticos e depois avaliados nas diferentes espécies selvagens. Entretanto, diferenças entre as diversas espécies são perceptíveis na biologia reprodutiva de felídeos e devem ser consideradas na extrapolação de protocolos experimentais (Silva, 2003). Há um consenso geral que a manutenção da diversidade genética de uma espécie é dependente da reprodução. Neste contexto, a aplicação de técnicas de reprodução assistida surge como importante ferramenta na conservação de espécies selvagens ameaçadas de extinção, na medida em que pode minimizar a perda da variabilidade genética por meios de programas reprodutivos (Morato e Barnabe, 1998). Uma alternativa bastante discutida para a preservação de espécies e da variabilidade genética é o banco de genoma, o qual armazenaria a longo prazo, material genético criopreservado, incluindo gametas e embriões de espécies ameaçadas de extinção (Morais, 1999). Entretanto, para o uso comercial da IA em gatos, um dos entraves são os protocolos de conservação do sêmen felino com baixa qualidade e sobrevivência espermática após a criopreservação (Pukazhenthil et al., 1999). A conservação de sêmen, seja pelo resfriamento ou pela congelamento, permite o transporte de material genético de animais de alto valor comercial por longas distâncias, facilitando significativamente a criação comercial e possibilitando, também, a troca de sêmen entre populações selvagens geograficamente isoladas, restaurando o vigor genético (Luvoni et al., 2003).

## **Conceito e Métodos de Criopreservação Seminal**

A criopreservação, ou preservação pelo frio envolve a refrigeração e a congelação, respectivamente com uso de temperaturas acima e abaixo do ponto de fusão dos líquidos para a conservação de células espermáticas (Luvoni et al., 2003). A refrigeração consiste na manutenção em um diluidor do sêmen entre 4 a 5°C. A temperatura e a composição do diluidor são fatores importantes para o sucesso deste processo (Batellier et al., 2001). Na congelação usa-se vapores de nitrogênio a -70°C e manutenção das amostras mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C por tempo indeterminado. Este método permite a utilização do sêmen em qualquer distância para técnicas reprodutivas e possuem grande potencial de conservação (Tebet, 2004). Muitas etapas estão envolvidas, como a separação do plasma seminal, diluição, refrigeração, congelação e descongelação (Luvoni, 2006).

O sêmen felino inicialmente era congelado em *pellets* (Platz e Seager, 1978), evoluindo para congelação em frascos (Lengwinant e Blotnner, 1994), até chegar ao protocolo padrão atual de congelação em palhetas (Zambelli et al., 2010). O sêmen felino vem sendo conservado segundo o padrão adotado para outras espécies carnívoras, com grande variação de protocolos entre os autores. Os diluidores de sêmen ainda mais empregados são o Tes e o Tris, isolados, adicionado de frutose ou glicose (Hay e Goodrowe, 1993), ou em conjunto, constituindo o TesT (Sánchez e Tsuitsui, 2002). Nos protocolos de conservação, estes diluidores são em geral adicionados de 10 a 20% de gema de ovo (Hay e Goodrowe, 1993; Baran et al., 2011) e nos casos de congelação de 3% (Hay e Goodrowe, 1993) a 4% de glicerol (Zambelli et al., 2002). Concentrações de 8% de glicerol são consideradas tóxicas aos espermatozóides felinos (Zambelli et al., 2002).

Grande parte dos trabalhos apresenta também diluidores acrescidos de antibióticos como a penicilina e a estreptomicina (Sánchez e Tsuitsui, 2002; Luvoni et al., 2003), a amicacina (Tebet, 2004). A adição do duodecil sulfato de sódio (Equex<sup>®</sup>) ao Tris, formando o Tris-Equex<sup>®</sup>, vem sendo testada. O duodecil sulfato de sódio, presente no Equex<sup>®</sup>, possui função de detergente biológico (Zambelli et al., 2010). Novos diluidores como o MP-50, composto por rafinose, glicose, lactose, citrato de sódio, e de potássio, EDTA, gema de ovo, leite em pó desnatado, meios de cultivo (Meio Hepes, Meio de

Dubelco's e Meio Eagle's Modificado), antibiótico (amicacina) e crioprotetores (glicerol e dimetilformamida -Tebet, 2004) também vêm sendo testados.

Recentemente a liofilização tem sido testada para preservar espermatozoides de mamíferos, entre eles, inclui-se o gato doméstico (Lopes, 2010).

### **Desafios da criopreservação: etapas a serem controladas**

Cada etapa envolve danos espermáticos e compromete a função espermática e o potencial de fertilização. As principais causas de danos durante a criopreservação são: a exposição a temperaturas não fisiológicas ou choque térmico e a consequente formação e dissolução de cristais de gelo do meio extra e intracelular; o estresse osmótico, por conta das altas concentrações de soluto (Watson, 2000); e o estresse oxidativo (Aitken e Krausz, 2001; Sikka, 2001; Agarwal et al., 2003). Para minimizar estes efeitos, substâncias conhecidas como agentes crioprotetores são adicionadas ao meio diluidor, alterando as propriedades físicas da solução. Estes crioprotetores podem atravessar ou não a membrana plasmática, dependendo de seu peso molecular (Watson, 2000). No intuito de preservar a qualidade espermática, é importante conhecer as características fisiológicas espécie-específicas do sêmen de felídeos. Resultados obtidos no passado baseavam-se exclusivamente na extrapolação dos protocolos já desenvolvidos para bovinos (Goodrowe, 1989).

#### *Controle da temperatura e estresse osmótico*

O resfriamento, assim como a congelação, pode causar estresse ao espermatozoide devido a mudanças de temperatura que resultam em danos espermáticos conhecidos como “choque térmico” (Watson, 2000; Luvoni, 2006). Um decréscimo na motilidade total e progressiva e percentual de células com acrossoma intacto é perceptível após o resfriamento e a congelação (Glover e Watson, 1985; Pukazhenti et al., 1999; Luvoni et al., 2003). Acredita-se que o abaixamento de temperatura durante a criopreservação causa alterações na permeabilidade da membrana (Watson, 1995; Luvoni, 2006). Em um estudo com resfriamento rápido (4°C/min) e ultra-rápido (14°C/min) observou-se danos acrossomais, enquanto no uso da taxa de resfriamento lento (0,5°C/min) observou-se redução dos danos acrossomais ao sêmen felino (Pukazhenti et al., 1999).

Contrariamente, outros trabalhos afirmam que o sêmen felino não foi afetado pela velocidade de resfriamento (Zambelli et al., 2002; Axner et al., 2004; Hermansson, 2006). Os danos espermáticos parecem estar mais ligados à etapa de congelação propriamente dita que ao resfriamento (Hermansson, 2006), mas o desenvolvimento de diluidores para a criopreservação a fim de melhorar a qualidade pós-descongelação é necessária. Na ocorrência de uma etapa de resfriamento pré-congelação de forma rápida, a substituição da água intracelular pelo crioprotetor não ocorre em igual velocidade para manter o equilíbrio e a água permanece, transformando-se em cristais de gelo quando atingidas temperaturas negativas, podendo causar ruptura da membrana e morte celular. Contrariamente, no resfriamento excessivamente lento, as células sofrem perda severa de água e por estarem expostas mais tempo a altas concentrações do soluto, também sofrem lesões celulares (Hammersted et al., 1990). Por diferentes mecanismos, ambas as situações extremas de abaixamento de temperatura podem ser danosas aos espermatozoides e os que resistem a este processo ainda sofrem os efeitos da descongelação e da remoção do crioprotetor (Agca e Crister, 2002). Entretanto, a velocidade de congelação ainda continua sendo alvo de estudos e comparações. Para tentar estabelecer a melhor taxa de congelação, Zambelli (2002) testou as taxas de 3,85; 9; 22,8; 36; 43 °C/ min com descongelação a 37 °C/ 30 segundos, onde a taxa de 3,85 °C/min foi superior as demais com 61,55% de motilidade pós-descongelação.

Outro fator a ser controlado para garantir melhores resultados pós-descongelação é a taxa de descongelação, realizada por muitos autores a 37 °C/30 seg (Zambelli et al., 2002; Tsutsui et al., 2003; Baudi, 2005) ou 60 seg (Silva, 2008). Taxas de descongelação a 46°C/12 seg (Villaverde, 2007) e 15 seg (Tebet, 2004) ou 70°C/6 seg (Chatdarong et al., 2007) são relatadas em protocolos de criopreservação, garantindo bons resultados de motilidade e de vigor.

O estresse osmótico é outro ponto crucial de controle necessário. Independente do método de conservação, as células espermáticas são submetidas a condições anisomóticas, promovendo redução do volume celular e sendo potencialmente letais às mesmas. Durante a fase de equilíbrio, no resfriamento de diferentes células biológicas, incluindo-se os espermatozoides de mamíferos, temperaturas negativas são atingidas e cristais de gelo extracelulares são formados. A quantidade de cristais de gelo aumenta à medida que diminui a temperatura, resultando em gradiente osmótico que gera

desidratação e enrugamento celular que causam danos celulares (Picton et al., 2000). O uso de agentes crioprotetores como glicerol, dimetil sulfoxido, etilenoglicol, e propanodiol tenta minimizar a formação destes cristais através da penetração nas células, prevenindo a formação letal de gelo intracelular. Entretanto altas concentrações de crioprotetores causam alterações de osmolaridade e levam ao efeito osmótico (Luvoni, 2006). A adição de crioprotetores causa inicialmente enrugamento do espermatozoide por conta do efluxo de água das células devido ao ambiente hiperosmótico, e então um inchaço, devido ao influxo de água e crioprotetor para manutenção de uma solução isotônica (Picton et al., 2000). Um extenso dano de membrana ocorre quando o sêmen do gato retorna de condições hiperosmóticas para uma solução isotônica (Phukazhenthithi et al., 2000). Normalmente o espermatozoide do gato é resistente a exposição hipertônica, mas células anormais são menos resistentes. Uma das razões é o comprometimento da função mitocondrial que pode ser afetada pelo choque osmótico, gerando decréscimo na motilidade (Gao et al., 1997).

Para o resfriamento do sêmen felino, o agente crioprotetor mais comumente utilizado é a gema de ovo, embora se afirme que sua adição não aumenta a sobrevivência dos espermatozoides felinos quando conservados a 5°C. A sua ação protetora se deve às lipoproteínas de membrana incluídas na sua fração de baixa densidade, protegendo a célula por interação com a membrana plasmática. A inclusão de monossacarídeos adiciona substrato energético, entretanto não representa vantagem real na estocagem de espermatozoides felinos (Luvoni et al., 2003). Sabe-se que gema de ovo previne o enrolamento da cauda do espermatozóide, favorecendo sua motilidade (Holt, 2000). Assim, uma boa dissolução da gema no diluidor é um ponto a ser controlado.

A temperatura de adição do crioprotetor, também é um fator variante entre os procedimentos de criopreservação, observando-se na literatura que para gatos domésticos a adição de glicerol pode ocorrer tanto a 20 °C (Zambelli et al., 2002) como a 4°C (Chatdarong et al., 2007). Além disto, o tempo de equilíbrio utilizado deve ser suficiente para que o crioprotetor exerça a sua ação benéfica de desidratação antes da congelamento (Silva, 2008). Após a etapa de glicerolização, Silva (2008) observou uma queda significativa da motilidade e do vigor em relação à diluição inicial, bem como no resultado pós-descongelamento, utilizando água de coco em pó (ACP-117) de 20% de

gema e 6% de glicerol. A injúria pós-descongelamento sofrida pelo espermatozóide e outras células viáveis ocasionada pela retirada brusca do glicerol é geralmente atribuída ao choque osmótico (Frim e Mazur, 1983, Schneider e Mazur, 1984).

#### *Estresse oxidativo e seu efeito sobre a fertilidade*

Células sob condições aeróbicas necessitam de oxigênio para dar suporte ao seu metabolismo, porém o excesso de metabólitos como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres podem gerar danos celulares. A formação de ROS é um evento fisiológico normal em vários órgãos, incluindo-se os testículos. Devido ao aumento da permeabilidade da membrana espermática, durante a criopreservação, ocorre um aumento na formação de ROS (Medeiros et al., 2002). A superprodução de ROS pode ser danosa e associada à infertilidade em machos (Akiyama, 1999, Yousef et al., 2003), porque as ROS podem iniciar a peroxidação lipídica e danos ao DNA, resultando em mutagênese, carcinogênese e morte celular (Devi et al., 2000). Segundo Munne-Bosh (2005), radicais livres e ROS como radicais hidroxilas, superóxidos e peróxido de hidrogênio contribuem para a peroxidação lipídica. O acúmulo de superóxidos é tóxico para a estrutura lipídica da membrana, resultando em alteração de permeabilidade e a possibilidade de desintegração de organelas. A peroxidação lipídica é a reação entre as ROS e ácidos poliinsaturados que ocorrem na membrana celular dos mamíferos. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a peroxidação lipídica e os antioxidantes. Um nível baixo de estresse oxidativo possui efeito benéfico sobre a célula espermática, porém em grande intensidade pode levar à morte celular (Aitken et al., 1996). As ROS destroem a membrana nesta interação com biomoléculas que induzem estresse oxidativo (Soo et al., 2007). Os testículos são alvo, pois possuem altas taxas de componentes lipídicos (Mishra e Acharya, 2004). O estresse oxidativo ocorre principalmente durante a preparação, criopreservação e incubação pós-descongelamento do sêmen e é considerado uma das causas de infertilidade mais importantes (Ball e Vo, 2002). O tempo de resfriamento e incubação pós-descongelamento é um fator crucial para a intensidade do estresse oxidativo. Thuwanut et al. (2008) demonstraram que em sêmen de gatos o aumento da peroxidação lipídica ocorre após 6 horas de incubação pós-descongelamento.

Na tentativa de superar a peroxidação durante a criopreservação, tem-se processado o sêmen sob condições anaeróbicas, realizando a adição de antioxidantes e inclusão de agentes quelantes (Aitken, 1996). Existem poucos estudos que avaliam o efeito deletério do estresse oxidativo no sêmen de felinos, porém já foi observada a ação benéfica da adição de alguns antioxidantes ao meio de criopreservação. Um estudo demonstrou que a adição de taurina ao meio diluidor à base de leite-glicose promove efeito protetor na célula espermática nas taxas de motilidade e morfologia de sêmen de gatos, resfriado a 5°C (Baran et al., 2009). Parte dos estudos publicados faz uso dos antioxidantes na alimentação, favorecendo a produção espermática e melhorando a qualidade seminal, bem como o número de células normais e a resistência ao processo de redução de temperatura usado no resfriamento e congelação seminais. Entre os diversos antioxidantes testados, são descritos o uso na alimentação de ômega 3 e 6 em equinos e suínos (Brinsko et al., 2005), ácido ascórbico associado ou não à vitamina E em coelhos (Castellini et al., 1999). A adição de vitamina E ou cisteína em meio tris-gema-Equex antes do congelamento melhorou a motilidade progressiva, integridade de membrana e DNA em sêmen epididimário de gatos domésticos após descongelação. Porém, não houve efeito protetor na integridade acrossomal (Thuwanut et al., 2008). Nem sempre observa-se um efeito benéfico após a adição de antioxidantes ao meio diluído. Thiangtum et al. (2009) observaram que a adição de catalase e superóxido dismutase não exerceram efeito positivo na motilidade, viabilidade e integridade acrossomal após a descongelação de sêmen de gatos diluído em tris-frutose-citrato de sódio e gema de ovo (EYT-FC). Mais estudos estão sendo conduzidos por diversos grupos de pesquisa e a possibilidade da adição de antioxidantes ao meio diluidor a fim de melhorar a qualidade seminal pós-descongelamento é bastante promissora.

#### *Efeito deletério do plasma seminal*

A presença do plasma seminal também é relatada como danosa à célula espermática, afetando a fertilidade. Assim, é indicada a centrifugação das amostras a baixa rotação (300g) e subsequente remoção do plasma seminal para prolongar o tempo de vida da célula (Luvoni et al., 2003; Moreira e Morato, 2007), especialmente na coleta por eletroejaculação na qual a quantidade de plasma seminal é maior (Silva et al., 2008). A qualidade espermática epididimária foi melhorada utilizando-se a técnica de



separação coloidal com centrifugação simples, resultando em menor percentual de defeitos de cauda e contaminação com hemácias resultantes do processo de coleta, comparado ao sêmen não tratado (Chatdarong et al., 2010). Na literatura, é possível encontrar relatos com e sem o uso da separação do plasma seminal para sêmen coletado por vagina artificial (Silva, 2008; Villaverde et al., 2009). Alguns trabalhos realizam a centrifugação pós-descongelamento e o concentrado de espermatozoides é re-suspendido em meio base (Baudi, 2005), ou a amostra após a descongelamento permanece incubada a 38°C por 5 min em meio base (Chatdarong et al., 2007) e somente após estes procedimentos as amostras são avaliadas quanto a motilidade pós-descongelamento.

#### *Viabilidade seminal pós-descongelamento*

Os resultados pós-descongelamento são bastante variáveis entre autores, desde < 30% (Tsutsui et al., 2000) a > 70% (Platz et al., 1978) de espermatozoides móveis, independente da origem de obtenção do sêmen (epidídimo, vagina artificial ou eletroejaculação). Tsutsui et al., (2003) relataram motilidade pós-descongelamento obtida para sêmen epididimário de 24%. Obtido por vagina artificial, relata-se 26% (Tsutsui et al., 2000), 52,8% (Villaverde, 2007), 70,6% (Platz et al., 1978) utilizando tris como diluidor base, e 25% utilizando ACP<sup>®</sup>-117 (Silva, 2008). E por eletroejaculação: 70% (Chatdarong et al., 2007). Resultados de 26% (15-40%) de motilidade pós-descongelamento obtidos por Tsutsui et al. (2000) garantiram gestação de 4 de 9 gatas inseminadas via intrauterina.

Segundo relatos, espermatozoides de gato coletados de epidídimo possuem motilidade e viabilidade mais baixa que o de ejaculado, entretanto não há diferenças entre os dois tipos celulares quanto à resistência à congelamento e descongelamento (Tebet et al., 2006; Hermansson e Axner, 2007). Além disto, espermatozoides de gatos podem ser mantidos no epidídimo estocado a 4°C por 24h sem nenhum decréscimo na qualidade, comparado às células extraídas imediatamente do epidídimo e conservadas em diluidor (Chatdarong et al., 2006).

Após a descongelamento, de 25 a 50% da motilidade é mantida em leões (*Panthera leo*), onças (*Panthera onca*), leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*), chitas (*Acinonyx jubatus*) e gatos leopardos (*Prionailurus bengalensis*- Graham et al., 1978 *apud* Silva et al., 2004). Os mesmos autores relatam baixos índices de motilidade após

descongelção (1 a 20%) para tigres (*Panthera tigris*), gato do mato grande (*Oncifelis geoffroy*), e jaguatirica (*Leopardus pardalis*); e que os espermatozoides do gato dourado africano (*Felis aurata*) não sobreviveram à criopreservação. Em todas estas espécies, a coleta foi realizada por eletroejaculação, que é o padrão para espécies não domésticas (Silva et al., 2008).

Os procedimentos de congelação seminal epididimária mudam entre os laboratórios, mas a integridade acrosomal pós-descongelção relatada continua sendo recorrentemente baixa (Hay e Goodrowe, 1993; Lengwinat e Blottner, 1994). O percentual de acrossomas intactos decresce 30 a 50% após criopreservação em amostras de sêmen epididimário (Hay e Goodrowe, 1993). A suplementação com Equex, no diluidor tris-gema de ovo para criopreservação melhorou a integridade acrosomal pós-descongelção, utilizando-se sêmen epididimário (Axner et al., 2004). Com este mesmo tipo de sêmen, já foram obtidos: ligação em zona pelúcida homóloga (Kashiwazaki et al., 2005), desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Thuwanut et al., dados não publicados) e ninhada após inseminação artificial intrauterina (Tsutsui et al., 2003).

Experimentalmente no Brasil, a técnica de IA intrauterina por laparotomiapermitiu 75% de gestação com o nascimento de ninhada degatos domésticos oriundas de ejaculados congelados e descongelados (Villaverde et al, 2009). A importância de bons resultados de viabilidade pós-congelação seminal são ainda mais expressivos quando aplicados aos felídeos não domésticos. Recentemente foi publicada a notícia da forma de produção e nascimento de 2 filhotes de gato-bravo-de-patas-negras (*Felis nigripes*). O sêmen de um macho da espécie foi congelado e, dois anos mais tarde, foi fecundado em óocitos, cultivando-se embriões que também foram congelados e implantados 6 anos depois. Os gatos-bravo-de-patas-negras são nativos das áridas regiões do sul da África e considerados um dos menores felinos selvagens do mundo, pesando pouco mais de 1kg quando adultos. Atualmente, estima-se que há apenas 40 deles no mundo. O próximo passo, segundo os cientistas, é clonar o gato-bravo-de-patas-negras e transferir o embrião para um gato doméstico (Guerra, 2011), servindo assim a criopreservação seminal como uma ferramenta de restauração de vigor genético.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diversas são as etapas que devem ser controladas para que melhores resultados pós-resfriamento e descongelamento sejam obtidos no processamento do sêmen felino. A melhoria destes resultados é de fundamental importância para sua aplicação prática na criação comercial e na conservação de espécies felíneas ameaçadas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

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

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

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

AKIYAMA, M. In vivo scavenging effect of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, v. 90, p.421–28, 1999.

AXNÉR, 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, n1-2, p.179-91, 2004.

BALL, B.A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. *J. Androl.*, v. 23, p. 259-69, 2002.

BARAN, A.; DEMIR, K.; SAHIN, B.R.; EVECEN, M.; BACINOGLU, S.; ALKAN, S.; ILERI, I.K. Short-term chilled storage of cat semen extended with and without

taurine containing milk extenders. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 8, p. 1367-1371, 2009.

BARAN, A.; TEK, C.; DEMIR, K.; SABUNCU, A.; ÖZDAS, Ö. B. Intrauterine insemination with cat semen frozen with various extenders. *Turkey Journal of Veterinary Animal Science*, v. 35, n.5, p.311-318, 2011.

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

BAUDI, D. L. K. Efeito de dois métodos de resfriamento sobre a função espermática in vitro de sêmen criopreservado de felinos (*Leopardustigrinus*, *Leoparduspardalise Feliscatus*), avaliada através de ensaio competitivo de ligação em ovócitos de gata doméstica (*Feliscatus*) 2005. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; DAY, B. C.; WILSON, M. E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology*, v. 63, p. 1519-1527, 2005.

CASTELINNI, C.; LATTAIOLI, P.; BERNARDINI, M. Effect of dietary supplementation with tocopheryl acetate and ascorbic acid on qualitative characteristics and fertilizing ability of rabbit semen. *World Rabbit Science*, v.7, p.217-220, 1999.

CHATDARONG, K.; BOONYEN, T.; RUNGSUK, C.; CHOWTRAKUL, C.; LOHACHIT, C. Freezing of cat epididymal spermatozoa after cool storage. In: *Proceedings of the 2nd symposium of the Asian zoo and wildlife medicine and the 1<sup>st</sup> workshop on the Asian zoo and wildlife pathology*, Bangkok, Thailand, p 20, 2006.

CHATDARONG, K.; AXNÉR, E.; MANEE-IN, S.; THUWANUT, P.; LINDEFORSBERG, C. Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen. *Theriogenology*, v. 68, p. 1326- 1333, 2007.

CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; MORRELL, J.M. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology*, v. 73, n.9,p. 1284-1292, 2010.

CORRADA, Y. A.; GOBELLO, M. C. Reproducción felina: características del gato doméstico. Asociación Argentina de Medicina Felina, Buenos Aires, 2000. Disponível em: <<http://www.aamefe.org.ar/>>. Acesso em: 04 abr. 2003.

DEVI, G. S.; PRASAD, M. H.; SARAWATHI, I.; RAGHU, D.; RAO, D. N.; REDDY, P. P. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clinical Chimica Acta*, v. 293, p.53-62, 2000.

FRIM, J.; MAZUR, P. Interactions of cooling rate, warming rate, glycerol concentration, and dilution procedure on the viability of frozen-thawed human granulocytes. *Cryobiology*, v.20, p.657-676, 1983.

GAO, D.Y.; MAZUR, P.; CRISTER, J.K. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: KAROW, M.; CRISTER, J.K. Reproductive tissue banking, San Diego: Academic Press, p. 263-328, 1997.

GLOVER, T.E.; WATSON, P.F. The effect of buffer osmolality on the survival of cat (*Feliscatus*) spermatozoa at 5 degrees °C. *Theriogenology*, v.24, n.4, p.449-456, 1985.

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

GUERRA, O. Felino em extinção nasce de fertilização in-vitro com sêmen congelado. (15/03/2011) - Originalmente publicada em 14/03/2011 pela National Geographic Brasil. Disponível em: <<http://planetasustentavel.abril.com.br/noticias/felino-extincao-nasce-fertilizacao-in-vitro-semen-congelado-621832.shtml>>. Acesso em: 30 mar. 2012.

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

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

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 degrees C. *Theriogenology*, v. 67, n. 7, p.1239-1248, 2007.

HERMANSSON, U. Studies of canine and feline sperm viability under different storage procedures: With special reference to chilling, freezing and use of zonapellucida binding assays. Doctoral Thesis, Uppsala, Sweden, f.38, 2006.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod.Sci.*, v.62, p.3-22, 2000.

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 zonapellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *Journal of Reproduction and Development.*, v. 51, n. 6, p.735-739, 2005.

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

LOPES, M.D. Reproductive technology in domestic carnivorous. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, n.2, p. 373-389, 2010.

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

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327- 344, 2002.

MISHRA, M; ACHARYA, U.R. Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated Swiss mice. *Journal of Trace Elements in Medicine Biology.*, v. 8, p.173-178, 2004.

MORAIS, R. N. Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos *Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758; *Leopardus weidii*, Schinz, 1821; e *Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775: sobre a função testicular (gametogênica e esteroidogênica) de machos em cativeiro,

incluindo variações sazonais. 177 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo). 1999.

MORATO, R. G.; BARNABE, R. C. Biotécnicas de Reprodução Aplicadas à Preservação de Felídeos Selvagens. *Clinica Veterinária*, v. 12, p. 24-26, 1998.

MOREIRA, N.; MORATO, R. G. Técnicas de Reprodução Assistida em Felídeos Neotropicais. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens- Medicina Veterinária*. p.1280- 1288, São Paulo: Roca, 2007.

MUNNE-BOSCH S. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. (Special issue: Vitamin E in plants, man and animals). *J Plant Physiol*, v. 162, p. 743-748, 2005.

PICTON, H.M.; KIM, S.S.; GOSDEN, R.G. Cryopreservation of gonadal tissue and cells. *British Medical Bulletin*, v. 56, n.3, p. 603-615, 2000.

PLATZ, C. C.; SEAGER, S. W. J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *Journal of Animal Veterinary Medicine*, v. 173, p.1353-1355, 1978.

PLATZ., C. C.; WILDT, D. E.; SEAGER, S. W. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen semen spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 52, p. 279-282, 1978.

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

PUKAZHENTHI, B.; NOILES, E.; PELICAN, K.; DONOGHUE, A.; WILDT, D.; HOWARD, J. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology* v. 40, n.2, p. 139-150, 2000.

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

SCHNEIDER, V.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, v.21, p.68-79, 1984.

SIKKA, S.C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medical Chemistry*, v. 8, v.7, p.851-862, 2001.

SILVA, A. R.; MORATO, R. G.; SILVA, L. D. M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Animal Reproduction Science*, v. 81, p. 159-175, 2004.

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

SILVA, T.F.P. Avaliação andrológica, métodos de coleta e tecnologia do sêmen de gatos domésticos utilizando água de coco em pó (ACP-117®), Fortaleza, 2008, 164 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias pela Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará), Fortaleza, 2008.

SILVA, T.F.P.; DIAS, C.G.A.; CARDOSO, J.F.S.; UCHOA, D. C.; BRAGA, A.C.P.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; BRILHANTE, D.F.M.; CARNEIRO, R.D.; TAVERNEZI, L.; QUINTO, H.R.; Silva, L.D.M. Comparação de quatro protocolos anestésicos para a coleta de sêmen por eletroejaculação em gatos domésticos. *Ciência Animal (UECE)*, v. 18, p. 15-23, 2008.

SOO, I.C.; BOHWAN, J.; PILJU, Y.; CHANGBO, P.; JUNG, D. P.; DOUG, Y.R. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.218, p.196-203, 2007.

SOUZA, H. J. M. Manejo hospitalar felino. *Brazilian Journal of Veterinary Science*, v.7, p.31-32, 2000.

STORNELLI, M. C.; STORNELLI, M. A. Evaluación, Criopreservacion de Semen e Inseminacion Artificial enel Gato Doméstico. Asociación Argentina de Medicina Felina, Buenos Aires, 2001. Disponível em: <<http://www.aamefe.org.ar/>>. Acesso em: 21 fev. 2004.

TEBET, J. M. Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardustigrinus*, Schreber, 1775), a jaguatirica (*Leoparduspardalis*, Linnaeus, 1758) e o gato doméstico (*Feliscatus*). 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.M.; CHIRINEA, V.H.; SOUZA, F.F.; CAMPAGNOL, D.; LOPES, M.D. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa, *Theriogenology*, v. 66, p.1629-1632, 2006.

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.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; TECHAKUMPHU, M.; AXNÉR, 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.

TSUTSUI, T.; TANAKA, A.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; MURAI, M. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 62, n.12, p.1247-1251, 2000.

TSUTSUI, T.; WADA, M.; ANZAI, M.; HORI, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 65, n.3, p. 397-399, 2003.

VILLAVERDE, A. I. S. B. Comparação entre dois métodos de inseminação artificial utilizando sêmen congelado em gatos domésticos. 2007, 101 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

VILLAVERDE, A.I.S.B.; MELO, C.M.; MARTIN, I.; FERREIRA, T.H.; PAPA, F.O.; TACONELI, C.A.; LOPES, M.D. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*) Artificial insemination in domestic cats. *Animal Reproduction Science*, v.114, p.434-442. 2009.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their postthawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v. 7, n.4, p.871-891, 1995.

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

YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*, v.76, p.99-111, 2003.

ZAMBELLI, D.; CANEPPELE, B.; CASTAGNETTI, C.; BELLUZI, S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 37, p.310-313, 2002.

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.