



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

BRENNNA DE SOUSA BARBOSA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE GATO
DOMÉSTICO (*Felis catus* – LINNAEUS, 1758) UTILIZANDO *Aloe vera***

MOSSORÓ

2017

BRENNA DE SOUSA BARBOSA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE GATO
DOMÉSTICO (*Felis catus* – LINNAEUS, 1758) UTILIZANDO *Aloe vera***

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus Mossoró, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Marcelo Barbosa Bezerra, Prof. Dr.

Co-orientador: Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr.

MOSSORÓ

2017

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

B238c Barbosa, Brenna de Sousa.
 Criopreservação de espermatozoides
 epididimários de gatos domésticos (*Felis catus* -
LINNAEUS, 1758) utilizando Aloe vera / Brenna de
Sousa Barbosa. - 2017.
 55 f. : il.

 Orientador: Marcelo Barbosa Bezerra.
 Coorientador: Alexandre Rodrigues Silva.
 Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2017.

 1. Criopreservação. 2. Felinos. 3. Aloe vera.
4. Espermatozoides. 5. Epidídimo. I. Bezerra,
Marcelo Barbosa, orient. II. Silva, Alexandre
Rodrigues, co-orient. III. Título.

BRENNA DE SOUSA BARBOSA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE GATO
DOMÉSTICO (*Felis catus* – LINNAEUS, 1758) UTILIZANDO *Aloe vera***

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus Mossoró, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 17 / 05 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

Marcelo Barbosa Bezerra, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente

Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador

Fernanda Araujo dos Santos, Msc. (UFERSA)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS que, sem dúvidas, foi o meu guia, me dando a tranquilidade e a determinação para concluir essa etapa. Sem contar, pelas pessoas maravilhosas que Ele colocou em meu caminho, que me fizeram acreditar que isso seria possível. O meu maior agradecimento vai para Ele.

Aos meus pais, Stênio Barbosa e Rosa Lenice de Sousa Barbosa, pelo amor incondicional, apoio e confiança. Essa vitória é uma forma de recompensa por todo o carinho e dedicação oferecidos a mim. Sei o quanto vocês dois abdicaram de seus sonhos para tornarem os meus possíveis e, por isso, sou eternamente grata. E mesmo com as diferenças de pensamentos vocês são a minha luz, meu porto seguro, o exemplo de ser humano que quero levar para toda vida. É por vocês que busco a cada dia melhorar, crescer.

A “Nia”, Bruna de Sousa Barbosa, minha irmã, pela amizade e por todos os momentos juntos compartilhados, incluindo as briguinhas na qual eu sempre perco. Obrigada minha irmã por sempre está ao meu lado e orar por mim.

A minha prima Diana Nara de Sousa Ribeiro por sempre ter acreditado, apoiado e, pelas inúmeras palavras de incentivo. Se hoje estou realizando essa conquista foi porque você foi o meu espelho, e, ainda é.

A Maria Gecilda Cordeiro de Sousa, minha segunda mãe, pelo carinho e apoio. A Maria Neuzirene Moreira de Oliveira, Estevão Nogueira Lima e Francisca Consolação da Silva Lima que sempre fizeram parte da minha vida, sempre amorosos, a vocês dedico essa conquista. Aos meus padrinhos, Edilson Cavalcante Rebouças e Francileuda Cavalcante Rebouças, e a todos da minha família que de alguma forma ajudaram, me apoiando e aconselhando.

Ao meu querido orientador, Professor Dr. Marcelo Barbosa Bezerra. Por ter me dado à oportunidade de estagiar em seu laboratório e pela confiança e liberdade dados a mim para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da minha cidade, Russas – CE, e aos que ganhei em Mossoró, da universidade, academia, vila, e outros lugares por onde passei. Em especial o quarteto fantástico: Luciano Lira de Oliveira, Renata Cristina Borges da Silva Macedo, Denilsa Pires Fernandes e Elias Silva Gallina por todos os momentos compartilhados. A Maria das Dores

Silva Rodrigues, minha irmã de coração, obrigada por sempre está ao meu lado, apoiando, incentivando e me alegrando. A sua amizade foi um presente de Deus.

Aos companheiros do Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In Vitro* de Embriões pelo aprendizado, companheirismo e pelos momentos de descontração e alegrias vividos durante esses 4 anos, que nos tornaram tão próximo quanto uma família.

O meu muito obrigada a “Chefa” Fernanda Araujo Santos pela sua participação no meu experimento, pelas sugestões para a escrita deste TCC e pelos ensinamentos ao longo dessa jornada. A Roberta Gonçalves Izzo, minha “mainha *made in* Mossoró”, por sempre está ao meu lado durante a rotina dos experimentos e em diversas outras situações da vida. A Luã Barbalho de Macêdo pela disponibilidade e participação fundamental para a realização das castrações. A Muriel Magda Lustosa Pimentel, Yago Dantas da Mata, Érika Almeida Praxedes, Denilsa Pires Fernandes, Henrique Albano Nogueira Gomes e as demais pessoas que se propuseram ajudar durante os experimentos.

Ao Professor Dr. Alexandre Rodrigues Silva por ter aceitado participar desse projeto, pelo auxílio teórico e por ter cedido os materiais fundamentais para a boa execução desse trabalho.

A equipe do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal da UFERSA coordenada pelo Professor Alexandre Rodrigues, em especial a Andréia Maria da Silva por dedicar parte de seu tempo na execução do experimento.

A todos os professores que passaram pela minha vida, me tocaram pela sua dedicação no papel de mestre e que de alguma maneira tiveram participação crucial na minha formação pessoal e acadêmico/profissional. Em especial a Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira, Profa. Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra e Profa. Dra. Gabriela Liberalino Lima.

“Ciência e vida cotidiana não podem nem devem ser separadas. A ciência, para mim, dá uma explicação parcial da vida. É baseada em fatos, experiências e experimentos... Concordo que a fé é essencial para ter sucesso na vida. Na minha opinião, tudo que é necessário para a fé é a crença de que, ao fazer o nosso melhor vamos chegar mais perto do sucesso e que o sucesso em nossos objetivos (o aperfeiçoamento do destino da humanidade, presente e futuro) vale a pena alcançar. ”

Rosalind Franklin

RESUMO

A criopreservação é uma biotécnica que permite a conservação das células a temperaturas abaixo do ponto de congelação da água, por tempo indeterminado. Em felinos domésticos esta técnica está associada a aspectos econômicos, permitindo a conservação de raças de grande estima; e, ecológicos visto que o gato doméstico é um excelente modelo experimental para os demais felídeos ameaçados em extinção. Atualmente existe uma crescente prospecção na utilização de substâncias vegetais que confirmam efeito crioprotetor as células espermáticas. Entre essas substâncias, a *Aloe vera* vem ganhando destaque devido à presença de compostos de ação crioprotetora. Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato bruto de *A. vera* na criopreservação dos espermatozoides epididimários do gato doméstico. Para tanto, foram utilizados 10 complexos testículos-epidídimos de gatos. A recuperação dos espermatozoides foi realizada pela técnica de fatiamento em placa de Petri contendo solução Tris pré-aquecida. O recuperado epididimário foi centrifugado, avaliado (concentração, análise CASA, vigor, motilidade, integridade da membrana, funcionalidade da membrana, morfologia e análise da condensação da cromatina) e, em seguida, destinado a três tratamentos distintos: controle (com 20% de gema de ovo), T10% (10% de *A. vera*) e T20% (20% de *A. vera*). Em seguida, os espermatozoides foram submetidos a 4 °C por 60 min, posteriormente, rampa de nitrogênio líquido por 20 min e armazenamento em botijão criogênico. A descongelação procedeu-se após um intervalo de uma semana, em temperatura de 37 °C por 30s. Durante o resfriamento observou-se a redução da motilidade em relação amostra fresca em ambos os tratamentos. Entretanto a redução dos parâmetros vigor e viabilidade só foram observados para o T10% e T20%. Quanto aos resultados após a descongelação, observou-se um declínio para motilidade e vigor em todos os tratamentos, sendo o tratamento T10% inferior aos demais. Embora o tratamento T20% apresentasse valores de motilidade similares ao controle após o descongelamento, apenas o controle permitiu a manutenção dos parâmetros vigor, viabilidade e funcionalidade da membrana durante todo o processo de criopreservação. Para a morfologia espermática, observou-se alterações na cauda durante o resfriamento no tratamento controle e alterações na peça intermediária para o T10%. Com base nos resultados pode-se concluir que a gema de ovo ainda apresenta-se como melhor crioprotetor para a conservação dos espermatozoides epididimários de gato doméstico; entretanto, a *A. vera* na concentração de 20% apresentou possível aplicabilidade como substância crioprotetora alternativa durante o resfriamento.

Palavras-chave: Criopreservação. Felinos. *Aloe vera*. Espermatozoides. Epidídimo.

ABSTRACT

Cryopreservation is a biotechnology that allows cells to be stored at temperatures below the freezing point of the water for an indefinite period of time. In domestic felines this technique is associated with economics, allowing conservation of races of great esteem; and, ecological as the cat is an excellent experimental model for the other endangered felines. Currently there is a growing exploration in the use plant substances that confer cryoprotective effect as sperm cells. Among the substances, *Aloe vera* has been gaining prominence due to the composition of cryoprotective action. The objective of this study was to evaluate the effect of different concentrations of crude extract of *A. vera* on cryopreservation of epididymal spermatozoa of the domestic cat. For this, 10 testis-epididymal complexes of cats were used. The recovery spermatozoa was performed by slicing technique in Petri dish slice containing preheated Tris solution. The spermatozoa epididymal was centrifuged, evaluated (concentration, CASA analysis, vigor, motility, membrane integrity, membrane functionality, morphology and chromatin condensation analysis) and then destined to three different treatments: control (with 20% egg yolk), T10% (10% of *A. vera*) and T20% (20% of *A. vera*). Then, the spermatozoa were submitted to 4 °C for 60 min, later, ramp of liquid nitrogen for 20 min and storage in cryogenic cylinder. The thawing proceeded after an interval of one week, at a temperature of 37 °C for 30s. During cooling the motility reduction was observed in relation to fresh sample in both treatments. However the reduction of the parameters vigor and viability were only observed for T10% and T20%. Regarding the results after thawing, a decline was observed for motility and vigor in all treatments, with T10 treatment being lower than the others. Although the T20% treatment presented similar control values after the thawing, only the control allowed the maintenance of the parameters vigor, viability and functionality of the membrane during the entire cryopreservation process. For the sperm morphology, changes were observed in the tail during cooling in the control treatment and changes in the intermediate part for the T10%. Based on the results, it can be concluded that egg yolk is still the best cryoprotectant for the preservation of domestic cat epididymal spermatozoa; however, *A. vera* at 20% concentration can be applied as a cryoprotectant during cooling.

Keywords: Cryopreservation. Feline. *Aloe vera*. Spermatozoa. Epididymal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Transporte e processamento do complexo testículo- epidídimo.....	30
Figura 2 – Obtenção do extrato bruto de <i>Aloe vera</i>	33
Figura 3 – Morfologia dos espermatozoides epididimários frescos de gatos domésticos....	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais componentes da <i>Aloe vera</i>	27
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação da cinética do movimento espermático de gatos domésticos para amostras do lavado epididimário frescas e resfriadas para os tratamentos Controle, T10% e T20%.....	35
Tabela 2 – Características das amostras espermáticas oriundas do epidídimo de gato doméstico por grupos (Amostra Fresca, Amostra Resfriada e Amostra Descongelada) e tratamentos (Controle, T10% e T20%) para as variáveis de motilidade, vigor, funcionalidade de membrana, integridade de membrana e condensação da cromatina.....	37
Tabela 3 – Morfologia e classificação dos defeitos espermáticos de gatos domésticos avaliados em diferentes momentos (Amostra Fresca, Amostra Resfriada e Amostra Descongelada) e tratamentos (Controle, T10% e T20%).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Água de coco em pó
ALH	Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça
<i>A. vera</i>	<i>Aloe vera</i>
BCF	Frequência do Batimento Flagelar
CASA	Computer- Assisted Sperm Analysis
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CTE	Complexo testículo-epidídimo
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DC	Defeito Morfológico de Cauda
DP	Defeito Morfológico de Peça Intermediária
DK	Defeito Morfológico de Cabeça
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dr	Doutor
HCl	Ácido Clorídrico
HOVET	Hospital Veterinário Dix-Huit Rosado
HOST	Teste hiposmótico
IA	Inseminação artificial
IAA	ácido 3- indol-ácetico
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
LIN	Linearidade (VSL/VCL)
LTG-PIVE	Laboratório de Transplante Gonadais e Produção <i>in vitro</i> de Embriões
MT	Motilidade Total
Msc	Mestre
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
TES	Ácido Sulfônico N- Tris-hidroximetil-metil-2-aminometano
TRIS	Tris (hidroximetil)aminometano
VA	Vagina Artificial
VCL	Velocidade Curvilínea
VAP	Velocidade Média da Trajetória
VSL	Velocidade Linear Progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
°C/min	Graus Celsius por minuto
cm	Centímetro
g	Força centrífuga
h	Horas
Hz	Hertz
mL	Mililitro
Min	Minutos
mM/L	Milimolar
s	Segundos
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µm/S	Micrometro por segundo
<	Menor que
>	Maior que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	Características gerais dos espermatozoides de gato doméstico.....	18
2.2	Aspecto econômico e ecológico da criopreservação dos gametas de gatos domésticos.....	19
2.3	Técnicas de recuperação dos espermatozoides na espécie felina.....	20
2.4	Criopreservação de espermatozoides em felinos domésticos.....	22
2.4.1	Diluidores.....	24
2.4.2	Crioprotetores.....	25
2.4.2.1	Crioprotetores penetrantes.....	25
2.4.2.2	Crioprotetores não penetrantes.....	26
2.5	A <i>Aloe vera</i> como crioprotetor não penetrante	26
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos Específicos.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	Colheita do lavado epididimário.....	30
4.2	Avaliação espermática.....	31
4.3	Confecção do extrato de <i>Aloe vera</i>	32
4.4	Criopreservação.....	33
4.5	Descongelamento.....	34
4.6	Análise estatística.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	Cinética do movimento espermático.....	35
5.2	Motilidade, vigor, integridade e funcionalidade da membrana e condensação da cromatina espermática.....	37
5.3	Morfologia espermática.....	41
5.4	Perspectivas da aplicação da <i>Aloe vera</i> na conservação dos espermatozoides.....	44
6	CONCLUSÃO.....	45
7	REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma biotécnica que permite a conservação de amostras biológicas a temperaturas abaixo do ponto de congelação da água, por tempo indeterminado (CASTRO et al., 2011). A aplicação dessa tecnologia ao sêmen de animais domésticos, de companhia ou de grande valor zootécnico, permite não apenas o armazenamento, mas o transporte para o uso em biotecnologias reprodutivas (MARTINS; JUSTINO, 2015). Em animais selvagens, essa biotécnica possibilita a manutenção da variabilidade genética, a partir da criação de bancos de germoplasma, os quais abrigam coleções-base de populações extintas ou em risco de extinção (SILVA et al., 2012).

O processo de criopreservação expõe os espermatozoides ao estresse celular e a condições desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade, afetando principalmente a integridade das membranas plasmáticas das células. Com o intuito de reduzir essas crioinjúrias são empregadas substâncias crioprotetoras, que modificam as propriedades físicas do diluente, tornando-o favorável a sobrevivência dos espermatozoides. Os crioprotetores, de modo geral, atuam impedindo a formação de cristais de gelo intracelular, através do efluxo de água; na redução do estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular; pela interação com íons e macromoléculas da célula promovendo estabilidade da membrana; e na redução do ponto de congelação da água, aumentando a fração não congelada do meio extracelular. Os crioprotetores podem ser classificados quanto a sua capacidade de atravessar ou não a membrana da célula em extracelulares ou não penetrantes e intracelulares ou penetrantes (SILVA; GUERRA, 2011).

Os crioprotetores rotineiramente aplicados na conservação das células espermáticas são o glicerol e a gema de ovo. Sabe-se que o glicerol, em determinadas concentrações e temperaturas, apresenta efeito tóxico sobre as células. Essa toxicidade varia significativamente entre as espécies, sendo para felídeos determinado que concentrações iguais ou superiores a 8% de glicerol são tóxicas aos espermatozoides (SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012; DECO-SOUZA et al., 2013).

Em contra partida, a gema de ovo é o crioprotetor extracelular que atua através da estabilização das membranas plasmáticas da célula, minimizando os efeitos negativos do choque térmico sobre a mesma. Embora a gema de ovo seja vastamente utilizada nos protocolos de criopreservação, problemas como composição variável e contaminação com microrganismos inviabilizam o intercâmbio de material biológico criopreservado com esta substância (SILVA; GUERRA, 2011; IVIS, 2017). Diante da problemática, diversas

substâncias de origem vegetal estão sendo investigadas quanto a sua capacidade de conferir proteção ao sêmen ou aos espermatozoides epididimários.

A *Aloe vera* apresenta-se como uma alternativa visto que possui substâncias similares aos crioprotetores convencionais em sua composição, além de exercer atividade antioxidante e atuar na regeneração celular (SOUSA; LIMA; SILVA, 2014). Dessa maneira, têm-se como objetivo desenvolver um protocolo de criopreservação de células espermáticas obtidas do epidídimo de gatos domésticos adultos utilizando extrato de *Aloe vera*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ESPERMATOZOIDES DE GATO DOMÉSTICO

No gato, o espermatozoide mede cerca de 26µm, sendo menor que as células espermáticas de outros animais domésticos, como os cães. A morfologia do espermatozoide se caracteriza por cabeça de formato oval alongado, com dois planos de simetria, um longitudinal e outro lateral. Cada célula espermática carrega em seu núcleo 20 cromossomos (19 autossômicos e X ou Y). Na secção longitudinal da cabeça observa-se uma matriz acrossomal densa constituída de centríolos envolvidos por material eletrondenso. Enquanto que, a peça intermediária é formada por um conjunto central de microtubulos rodeados por estruturas externas (microtubulos e hastes densas) (JOHNSTON et al., 2001).

Os espermatozoides felinos apresentam características morfológicas e fisiológicas peculiares que dificultam a sua manipulação e conservação. A teratozoospermia, condição na qual 60% ou mais dos espermatozoides mostram-se aberrantes, é bastante presente nos ejaculado e lavado epididimário dos felinos. Geralmente, os espermatozoides teratozoospermicos apresentam uma gota citoplasmática retida, resultando em angulações na peça intermediária e no flagelo, defeitos no acrossoma, anormalidades na cromatina e fragmentação do DNA ou condensação incompleta (LUVONI, 2006). A teratozoospermia pode estar associada a uma diminuição da variação genética e a uma diminuição da secreção de testosterona (FILLIERS et al., 2010). Outras alterações morfológicas encontradas com frequência nos espermatozoides dos felinos são a macro e microcefalia, cabeças duplas ou destacadas e caudas duplas, dobradas ou enroladas (FLORINDO, 2011). A morfologia espermática está intimamente relacionada ao potencial reprodutivo do animal.

Espermatozoides oriundos do ejaculado podem apresentar maior porcentagem de anomalia na cauda; enquanto nos espermatozoides epididimários são encontrados, com maior frequência, gota citoplasmática distal, que provavelmente está relacionada ao processo de maturação no epidídimo (FLORINDO, 2011). Entretanto, Goodrowe e Hay (1993) relataram que espermatozoides oriundos do epidídimo e do ejaculado não apresentaram divergências na quantificação morfológica, tanto para valores normospermicos quanto teratospémicos. Florindo (2011) também demonstrou que os espermatozoides epididimários e do sêmen, obtido pela técnica de cateterização uretral, não divergiram quanto à morfologia.

As células espermáticas normais apresentam movimento progressivo retilíneo. É relatado motilidade de 70% – 95% para espermatozoides oriundos do ejaculado e

(CHATDARONG et al., 2010), 50% – 75% para espermatozoides obtidos do epidídimo (COCCHIA et al., 2010).

2.2. ASPECTO ECONÔMICO E ECOLÓGICO DA CRIOPRESERVAÇÃO DOS GAMETAS DE GATOS DOMÉSTICOS

A biodiversidade vem apresentando uma redução acelerada nas últimas décadas. Diante disso, surgiu a necessidade de introduzir biotecnologias na reprodução animal, de forma a permitir a preservação dos recursos genéticos (SILVA et al., 2012). Dentre essas biotecnologias, a criopreservação de espermatozoides do epidídimo é uma ferramenta potencial para o resgate de material genético dos machos de populações ameaçadas, que subitamente vieram a óbito e/ou foram submetidos a procedimentos médicos no qual se fazia necessário a sua castração. Adicionalmente, a criopreservação permite a aplicação desse material em diversas técnicas de reprodução assistida (COCCHIA et al., 2010).

A criopreservação é um procedimento de submissão das células, tecidos e/ou embriões a uma refrigeração moderada e controlada, com posterior armazenamento em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C , possibilitando sua conservação e utilização para procedimentos futuros (SILVA; GUERRA, 2011). Os protocolos de criopreservação de espermatozoides são estabelecidos com base em características físicas celulares a fim de manter a viabilidade e limitar os danos de membrana que podem ocorrer durante a submissão a condições não fisiológicas (SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012).

O uso de animais domésticos como modelo em pesquisas de reprodução mostra-se como um instrumento útil na obtenção de informações sobre as características de espermatozoides e oócitos. A validação desses modelos permite a criação de protocolos eficientes para a manutenção da viabilidade dos gametas após a descongelação, bem como o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas potencialmente aplicáveis para animais selvagens ameaçados de extinção (LUVONI, 2006).

Atualmente, existem 38 espécies de felídeos, onde, apenas o gato doméstico (*Felis catus*) não se encontra ameaçado de extinção (IUCN, 2016). Por esse motivo e devido ao amplo conhecimento de sua fisiologia reprodutiva, ele se torna excelente modelo experimental para as demais espécies de felídeos. A técnica de criopreservação do sêmen de gato doméstico ainda produz resultados variáveis, devido algumas características peculiares dos espermatozoides dessa espécie. Entretanto, os protocolos já existentes são promissores e possuem implicações importantes quanto à conservação da biodiversidade, possibilitando a recuperação, o armazenamento por tempo indefinido e o intercâmbio de germoplasma de

felídeos preciosos (MACENTE et al., 2012). Além disso, tem crescido a demanda de reprodução assistida entre os criadores de felinos domésticos devido à pequena variação genética entre as raças existentes hoje no mercado (ZAMBELLI et al., 2010).

A criação doméstica de gatos tem crescido em vários países, principalmente nas capitais, visto a menor necessidade de espaço e cuidados quando comparado com outros animais de estimação (CORRADA; GOBELLO, 2000; SOUZA, 2000). Tal atividade também apresenta caráter econômico, alavancado um mercado de produtos e serviços especializados. Entre esses serviços, as biotécnicas reprodutivas permitem a potencialização da capacidade reprodutiva dos animais e, portanto é crescente a demanda por serviços de avaliação andrológica e inseminação artificial (IA) (SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012). Adicionalmente, técnicas de recuperação e criopreservação de amostras biológicas, tais como espermatozoides, permite a preservação de gametas de animais de companhia de alto valor genético ou grande estima (MELLO, 2007).

2.3. TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO DOS ESPERMATOZOÍDES NA ESPÉCIE FELINA

Para a realização da criopreservação dos espermatozoides é necessário inicialmente promover a colheita dos mesmos. A obtenção de espermatozoides em felinos pode ser realizada através de eletroejaculação, vagina artificial, lavagem da vagina pós-coito, cateterização uretral ou pelo processamento dos epidídimos de animais submetidos à esterilização cirúrgica ou que vieram a óbito (EMERENCIANO et al., 2013). Recentemente foi proposto a colheita de espermatozoides pela técnica da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (LEITE, 2009).

A PAAF permite a obtenção de material biológico de animais sub ou inférteis importantes geneticamente para a espécie, a partir de uma agulha de diâmetro bem reduzido acoplada a uma seringa. A aplicação da PAAF ainda não foi completamente estabelecida, visto que a técnica provoca lesões ao epitélio germinativo dos túbulos e, conseqüentemente danos à função dos testículos (PAZ et al., 2003; LEITE, 2009; DOMINGOS; SALOMÃO, 2011; GOULETSOU et al., 2011).

A eletroejaculação é a técnica de eleição para felinos selvagens e para a maioria dos gatos domésticos, visto que os animais permanecem anestesiados durante todo o processo. A eletroejaculação consiste na aplicação de uma série de pulsos elétricos alternados, a partir de uma sonda introduzida no reto do animal, que desencadeiam a ejaculação (FERREIRA; FILHO; FUGIHARA, 2009). Existem diversos protocolos de estimulação elétrica para felinos. De modo geral, esses protocolos consistem em um serie de três de estímulos (30, 30 e

20 segundos) de 2 a 6 volts, com descanso entre as séries de 5 minutos (MARTINS; JUSTINO, 2015). Mesmo sendo eficiente, a eletroejaculação apresenta desvantagens associadas à diluição seminal, visto que aumenta a secreção das glândulas sexuais acessórias; além de contaminação das amostras por urina e consequentemente, perda da motilidade dos espermatozoides; outra dificuldade relatada é ejaculação retrógrada para a bexiga (ERDMANN et al., 2013).

A vagina artificial (VA) é um aparato que mimetiza as condições fisiológicas de pressão e temperatura da vagina. É o método mais próximo da monta natural e para isso, os gatos devem passar por um treinamento de 2 a 3 semanas. Durante a coleta, utilizam-se fêmeas em estro ou manequins de pelúcia para despertar o interesse do macho e no momento da monta, faz-se o desvio do pênis do animal, introduzindo-o na vagina artificial (BEZERRA et al., 2013; MARTINS; JUSTINO, 2015).

A lavagem da vagina pós-coito é uma técnica rústica utilizada quando não há a disponibilidade de quaisquer aparatos ou equipamentos para promover a colheita dos espermatozoides. Basicamente, consiste na sedação da fêmea logo após a cópula, seguida da lavagem do canal vaginal com solução fisiológica pré-aquecida para promover a recuperação dos espermatozoides ainda presentes na estrutura. Embora seja uma técnica simples, a lavagem vaginal possui pouca aplicabilidade em felinos selvagens; além disso, os espermatozoides coletados podem sofrer alterações relacionadas ao método (SILVA, 2008; MOREIRA, 2017; MARTINS; JUSTINO, 2015).

A colheita pela cateterização uretral consiste na aplicação de um fármaco anestésico alfa-adrenérgico, geralmente a medetomidina, que estimule a liberação dos espermatozoides na uretra, seguida da introdução de um cateter urinário na uretra, de modo a atingir apenas a porção prostática do ducto, sem alcançar a bexiga; posteriormente, o cateter é removido a fim de recolher o sêmen (MOREIRA, 2017). A cateterização uretral é uma técnica promissora para os felinos selvagens livres visto que dispensa o uso do eletroejaculador (ZAMBELLI et al., 2008; LUEDERS et al., 2012; PROCHOWSKA, 2014; ARAUJO, 2016).

A recuperação de espermatozoides a partir do epidídimo é uma técnica utilizada para dar suporte à reprodução assistida, além disso, é de suma importância para avanços nas pesquisas de preservação de germoplasma, principalmente de felídeos selvagens (MACENTE et al., 2012). A perspectiva de armazenamento do complexo testículo-epidídimo, em temperatura ambiente por até 5 horas ou sob refrigeração a 5 °C após a morte do animal, permitindo o resgate dos gametas sem grande perda da viabilidade e, posterior processamento

e criopreservação, aumenta a aplicabilidade dessa técnica em diferentes espécies de mamíferos (FILHO; SILVA, 2012).

A colheita de espermatozoides epididimários pode ser realizada por diferentes abordagens a depender da espécie do animal. Em animais de companhia, devido ao tamanho reduzido do epidídimo, é mais adequado realizar o fatiamento ou a flutuação. É interessante que antes dessas técnicas, se realize a remoção dos vasos sanguíneos próximos à estrutura do epidídimo para evitar a contaminação das amostras com sangue. A flutuação consiste no corte da estrutura epididimária e, em seguida, o repouso em um meio diluidor, para favorecer a migração dos espermatozoides para o meio. No fatiamento, técnica similar a anterior, o epidídimo é seccionado em numerosos fragmentos e comprimido suavemente, com auxílio de pinças e/ou seringas, para promover o extravasamento do líquido epididimário. Também pode se promover um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo aplicando pressão com uma seringa contendo diluente, fazendo com que o conteúdo saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo. Outra técnica é a aspiração direta do material na cauda do epidídimo, também com o auxílio de seringa e agulha (ANGRIMANI et al., 2013).

Posteriormente à colheita, avaliações microscópicas devem ser realizadas, tais como análise da motilidade espermática, vigor, concentração e morfologia espermática (MARTINS; JUSTINO, 2015).

2.4. CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EM FELINOS DOMÉSTICOS

A criopreservação é uma tecnologia que permite a conservação de amostras biológicas a temperaturas abaixo do ponto de congelação da água. A criopreservação tem como princípio manter as células em estado quiescente, preservando sua composição e viabilidade por tempo relativamente longo (refrigeração) ou indeterminado (congelamento) (SILVA; GUERRA, 2011). No processo de criopreservação as amostras são submetidas às seguintes etapas: queda de temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento (HARTWIG; PAPA; DELL'AQUA, 2012).

A primeira tentativa de criopreservação de espermatozoides do ejaculado de gato e, posterior utilização em inseminação artificial foi relatada por Platz, Wildt e Searge (1978). Desde então, a técnica foi aperfeiçoada e um grande número de protocolos foi desenvolvido. A eficiência dos protocolos de conservação do sêmen e/ou espermatozoides depende da composição do diluente, da concentração adequada de crioprotetores e de uma taxa ideal de congelamento (HUSSAIN; LESSARD; ANZAR, 2011).

Durante o processo de criopreservação é importante controlar a taxa de refrigeração da amostra de sêmen e/ou lavado epididimário. Sabe-se que as células submetidas à curva de congelação sofrem modificações na fluidez da membrana plasmática e estão sujeitas ao rompimento devido à formação e agrupamento de pequenos cristais de gelo. Adicionalmente, em resposta ao resfriamento ocorre a translocação dos fosfolipídios entre os folhetos da bicamada lipídica no intuito de se adequar a mudança de temperatura (SILVA; GUERRA, 2011). Diversas curvas de congelação foram propostas na tentativa de conservar as células espermáticas de gatos domésticos e, assim estabelecer a melhor curva de congelação. Cocchia et al. (2010) realizaram o resfriamento dos espermatozoides, a 4 °C por 60 minutos, antes de submetê-los a vapor de nitrogênio, obtendo resultados satisfatórios na conservação dos espermatozoides epididimários de gatos e tigres. Já Bonaura et al. (2013) submeteram as amostras biológicas a 20 minutos de resfriamento, sendo observadas alterações na membrana plasmáticas, no acrossoma e nas mitocondriais dos espermatozoides congelados-descongelados. Sabe-se que taxas mais lenta de refrigeração (0,2 a 0,5 °C/ min) minimizam os danos causados às membranas plasmáticas e acrossomais dos espermatozoides (PUKAZHENTHI et al., 1999).

A centrifugação das amostras biológicas também se faz necessária, principalmente, quando estas são oriundas da ejaculação. Espermatozoides epididimários também devem ser submetidos à centrifugação a fim de promover a lise das células sanguíneas oriundas dos vasos adjacentes ao epidídimo que possivelmente contaminam a amostra (KUNKITTI et al., 2016). É recomendada a centrifugação das amostras a baixa rotação (SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012). Na literatura, a força de rotação empregada para espermatozoides epididimários variou de 300–800g por 5 a 20 minutos (CHATDARONG; THUWANUT; MORRELL, 2010; COCCHIA et al., 2010; WAURICH et al., 2010; MACENTE et al., 2012).

Assim como as demais etapas, a descongelação dos espermatozoides é extremamente relevante na garantia da manutenção da motilidade e, consequentemente da capacidade de fecundação dessas células, devendo ser rigorosamente controlada (SILVA; MOTA-FILHO, 2012). A descongelação é realizada por imersão das palhetas de 0,25ml em banho-maria à 37 °C por 30 ou 40 segundos (MARTINS; JUSTINO, 2015). Entretanto, outras temperaturas e tempos são relatados em protocolos de criopreservação, com bons resultados. Após a descongelação, cerca de 25 a 50% da motilidade espermática é mantida (SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012).

2.4.1. Diluentes

Os diluentes são meios responsáveis pela manutenção da sobrevivência dos espermatozoides. Estes fornecem o substrato para o metabolismo energético da célula, promove a pressão osmótica adequada, protege a membrana espermática do choque térmico, além de apresentar ação tamponante e atuar reduzindo os danos aos espermatozoides durante a criopreservação (MARTINS; JUSTINO, 2015).

Os principais diluentes usados para gato doméstico consistem no Tris (tris-hidroximetil-aminometano) e TES (ácido sulfônico N-tris-hidroximetil-metil-2-aminometano) adicionados de açúcares, que servem como substrato energético (SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012). O TRIS é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente na forma cristalizada, que atua como um tampão iônico bipolar em pH 7,0 – 9,0. O diluente TRIS promove a redução do metabolismo da frutose nos espermatozoides e, consequentemente a preservação da sua energia (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008).

Como alternativa aos diluentes convencionais podem ser utilizadas soluções a base de água de coco em pó ou *in natura* e/ou diluidores comerciais (SILVA et al., 2007; JIMÉNEZ et al., 2013). A água de coco possui o princípio ativo IAA (ácido 3- indol-ácetico) que apresenta ação protetora sobre o espermatozoide, conservando sua motilidade (BARROS; TONIOLLI, 2011). Entretanto, quando esta (água de coco em pó – ACP 117) foi comparada com o diluidor Tris, na recuperação de espermatozoides epididimários de felinos domésticos, apresentou resultados inferiores no parâmetro motilidade espermática (EMERENCIANO et al., 2013).

Jiménez et al. (2013) realizaram a criopreservação utilizando os diluidores comerciais: Triladyl, AndroMed e Gent, sendo o primeiro o mais adequado para a congelação dos espermatozoides epididimários de gatos domésticos. Já Macente et al. (2012) propuseram a recuperação dos espermatozoides epididimários de gatos empregando o diluente Botu-crio[®] e posterior resfriamento, durante 24 horas, no meio Botu-tainer[®], obtendo valores de motilidade de $67,5 \pm 13,1\%$ e $23,7 \pm 13,8\%$ para pós-resfriado e descongelção, respectivamente.

Algumas soluções diluidoras são acrescidas de antibióticos, como penicilina e estreptomicina, a fim de prevenir possíveis contaminações microbiológicas do material biológico, bem como, antioxidantes para minimizar o estresse oxidativo ao qual a célula espermática é exposta (SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012).

2.4.2. Crioprotetores

Crioprotetores são substâncias que promovem alterações nas propriedades físicas da solução diluente, protegendo as células dos possíveis danos deletérios durante o processo de criopreservação, retardando a formação de cristais de gelo intracelular e a desidratação celular. Um excelente crioprotetor é aquele que apresenta proteção contra as crioinjúrias e não exibe toxicidade as células. Os agentes crioprotetores a depender do seu peso molecular podem penetrar na membrana plasmática (extracelulares) ou não (intracelulares) (CASTRO et al., 2011).

2.4.2.1. Crioprotetores penetrantes

Os crioprotetores penetrantes são solventes de baixo peso molecular que, devido esta característica atravessam a membrana plasmática por difusão passiva e, permanecem no interior das células. Essa classe de crioprotetores apresenta atuação tanto intra quanto extracelular nos espermatozoide, pois promovem o efluxo da água intracelular para equilibrar o meio externo (SILVA; GUERRA, 2011).

O mecanismo de proteção as crioinjúrias dos crioprotetores penetrantes deve-se a sua propriedade coligativa com a água, aumentando a viscosidade da solução, consequentemente, reduzindo o ponto de congelação da mesma e prevenindo a formação de cristais de gelo intracelular; além disso, diminuir a pressão osmótica do meio através da ligação com eletrólitos ou substituição parcial da água (CASTRO et al., 2011).

Os crioprotetores penetrantes podem ser classificados ainda em alcoólicos, como o glicerol, o Etilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO), ou amidas, como a acetamida e a dimetilformamida (BITTENCOURT et al., 2013).

O glicerol (ou propano-1, 2,3-triol) é o crioprotetor mais comumente utilizado na criopreservação de diversas espécies de mamíferos. Em gatos é empregado o glicerol nas concentrações de 4-5%, visto que os espermatozoides dessa espécie são sensíveis a concentrações mais elevadas (SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012). O Glicerol atua diretamente na membrana plasmática, ligando-se aos fosfolipídios presentes na cabeça do espermatozoide, reduzindo sua fluidez e interagindo com ligações proteicas e glicoproteicas da membrana. O glicerol pode ser adicionado no momento da diluição inicial, à temperatura ambiente, quando o crioprotetor está em concentração total no diluente utilizado, ou após a refrigeração do sêmen, a 4 – 5 °C, a fim de reduzir seus efeitos tóxicos (SILVA; GUERRA, 2011).

2.4.2.2. Crioprotetores não penetrantes

Os crioprotetores não penetrantes são macromoléculas de peso molecular elevado que atuam induzindo a saída da água intracelular, por meio do efeito osmótico e, conseqüentemente, reduzir a formação dos cristais de gelo (SILVA; GUERRA, 2012). Entre os crioprotetores extracelulares estão os açúcares (como a rafinose, trealose), as proteínas do leite e as lipoproteínas da gema de ovo (BITTENCOURT et al., 2013).

A gema de ovo é amplamente utilizada em diversos protocolos para diferentes espécies. Para felinos se preconiza concentrações entre 10% a 20% de gema de ovo no meio diluidor (SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012). O mecanismo de ação da gema sobre a célula espermática não é totalmente elucidado, porém sabe-se que esta atua estabilizando as membranas, minimizando os efeitos negativos do choque térmico. Todavia, a gema apresenta algumas desvantagens, visto ser um produto de origem animal e, portanto possuir composição variável, além de poder propagar microrganismos patogênicos. Sabe-se também que algumas substâncias da gema dificultam a respiração celular, interferindo no sistema de transporte de elétrons nas mitocôndrias (SILVA; GUERRA, 2011; SOUZA; LIMA; SILVA, 2014).

Diante dessa problemática, diversos pesquisadores vêm propondo o emprego de substâncias alternativas a utilização da gema de ovo. Vick et al. (2012) sugeriram a utilização da lecitina da soja na criopreservação do sêmen de gato, alcançando resultados superiores quanto a manutenção da motilidade a longo prazo, obtendo valores de $52,1 \pm 13,4\%$; $47,9 \pm 14,1\%$; $36,7 \pm 6,5\%$ e $11,3 \pm 8,3\%$ para 1h, 3h, 6h e 24h após a descongelação, respectivamente, em comparação com a gema de ovo ($46,7 \pm 13,7\%$; $34,2 \pm 11,6\%$; $16,3 \pm 8,3\%$ e $2,1 \pm 3,3\%$ para 1h, 3h, 6h e 24h, respectivamente).

2.5. A ALOE VERA COMO CRIOPROTETOR NÃO PENETRANTE

A *Aloe vera* é uma planta nativa do norte da África, que apresenta inúmeras atividades farmacológicas, entre elas propriedades regeneradoras, antioxidantes, antibacteriana e antifúngica (FREITAS; RODRIGUES; GASPI, 2014). Atualmente, alguns estudos investigam a ação protetora do extrato de *Aloe vera* sobre a membrana das células espermáticas quando submetidas a processos de resfriamento ou congelação, visto que a mesma apresenta em sua composição substâncias similares aos crioprotetores convencionais, e, portanto, pode ser explorada como alternativa para crioproteção do sêmen de diferentes espécies (MELO, 2010; FARIAS et al., 2012; VARGAS, 2012; SOUSA; LIMA; SILVA, 2014; SOUZA et al., 2016). Na literatura, relatos da utilização do gel de *Aloe vera* são

descritos desde a década de 80, quando Rodriguez et al. (1988) utilizaram como diluente seminal para inseminação artificial em ovelhas.

Posteriormente, outros trabalhos foram realizados testando o extrato da *Aloe vera* associada à diluidores convencionais ou a outras substâncias vegetais para diferentes espécies. Melo (2010) utilizou o extrato bruto do vegetal em combinação com água de coco em pó (ACP-101) no resfriamento do sêmen caprino a 4 °C, obtendo boa qualidade espermática por até 48 horas. Vargas (2012) empregou a *Aloe* em diferentes concentrações (10%, 15% e 25%) na criopreservação de espermatozoides de touros, verificando que a 10% a substância apresentou os melhores resultados quanto à motilidade e integridade estrutural dos espermatozoides. Recentemente o uso do extrato de *A. vera* aplicado na conservação de sêmen caprino e ovino apresentou resultados satisfatórios (CÂMARA et al., 2012; AGUIAR et al., 2012). Também já foi descrito o uso da *A. vera* na criopreservação do sêmen de catetos, sugerindo sua utilização a uma concentração de 20% no meio extensor (SOUZA et al., 2016).

A *Aloe vera* apresenta mais de 200 substâncias bioativas, entre elas polissacarídeos, tanino, esteroides, antraquinonas, vitaminas, enzimas, minerais, compostos fenólicos, saponinas e ácidos orgânicos (Quadro 1). Entre os polissacarídeos, destacam-se os derivados de glicose e manose como fontes de energia para os espermatozoides, sendo importantes para sua preservação em curto prazo. Além disso, sabe-se que os açúcares apresentam efeito crioprotetor extracelular, contribuindo para a estabilidade da membrana dos espermatozoides. A presença de polifenóis, indóis, alcaloides, ácido fólico e zinco no extrato de *Aloe vera* confere ação antioxidante e, portanto atua na prevenção do sêmen contra danos oxidativos. A propriedade antiviral, antifúngica e antibacteriana que o extrato também possui está associada à presença de fenol, saponina e antraquinonas (SOUZA et al., 2016).

Quadro 1. Principais componentes da *Aloe vera*

Componentes da <i>Aloe vera</i>	
Vitaminas	A, C, E e Complexo B (B1, B2, B3, B6, B12);
Minerais	Fosfato de Cálcio, Potássio, Ferro, Sódio, Colina, Magnésio, Manganês, Cobre, Cromo;
Mono e polissacarídeos	Celulose, Manose, Alínase, Glicose, L-raminose, Aldopentose;
Aminoácidos essenciais	Lisina, Valina, Leucina, Isoleucina, Metionina, Triptofano, Fenilalanina, Treonina, Histidina;
Enzimas	Catalases, Celulases, Fosfatase, Amilase, Nucleotidase, Brandiquinases;
Outras substâncias	Saponinas, Antraquinonas, Aloína, Ácidos graxos (caprílico), Isobarbalóina, Aloe Emodin, Ácido Aloético.

Fonte: Adaptado de MELO (2010).

Para Vargas (2012), o emprego da *Aloe* na conservação do sêmen é justificado pela propriedade surfactante que esta apresenta. Substâncias surfactantes apresentam uma porção lipossolúvel e outra hidrossolúvel, o que permite sua ocupação na interface de dois líquidos. A ação de substâncias surfactantes sobre a membrana espermática não está totalmente elucidada, mas sabe-se que, de modo geral, essas substâncias aumentam a permeabilidade da membrana dos espermatozoides e, com isso, promove a redução no estresse osmótico (VARGAS, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização da *Aloe vera*, em diferentes concentrações, associadas ao glicerol e diluída em TRIS, no processo de criopreservação dos espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*F. catus*).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar duas diferentes concentrações da *Aloe vera* na criopreservação dos espermatozoides epididimários;
- Comparar a atividade crioprotetora da *Aloe vera* com a gema de ovo;
- Avaliar a ação crioprotetora do extrato de *Aloe vera* durante o processo de resfriamento das amostras de espermatozoides epididimários;
- Avaliar qual concentração de *Aloe vera* apresentará melhor efeito crioprotetor sobre os espermatozoides epididimários congelados.

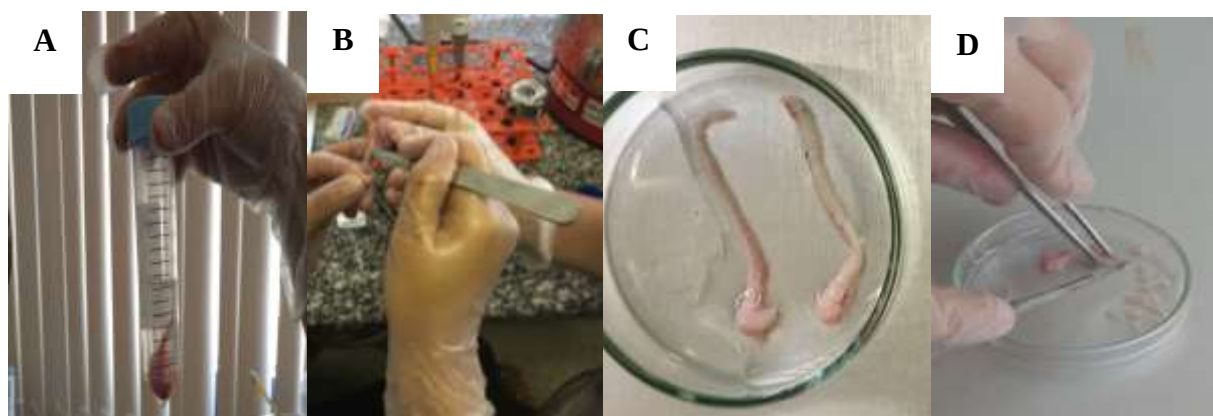
4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. COLHEITA DO LAVADO EPIDIDIMÁRIO

Os espermatozoides epididimários foram obtidos a partir do aproveitamento de complexos testículos-epidídimos (CTEs) provenientes de castrações eletivas realizadas rotineiramente no Hospital Veterinário (HOVET) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), estando dessa maneira, em total conformidade com as recomendações do Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (1988), sendo aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEUA) da mesma instituição sob o protocolo 23091.000407/2017.17.

Foram colhidos CTEs de dez gatos adultos e saudáveis com idade entre 12 e 34 meses. Após a colheita, as gônadas foram transportadas à temperatura ambiente até o Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In Vitro* de Embriões (LTG-PIVE) em tubos cônicos plásticos de 50 mL contendo solução salina 0,9% acrescida de penicilina (Figura 1A). A abordagem do CTE ocorreu através da técnica de fatiamento como descrito por Da Silva e Mota-Filho (2012). A estrutura anatômica da cauda do epidídimo foi separada das demais (Figura 1B), posteriormente transferida para placa de Petri contendo 1mL de solução TRIS pré-aquecida a 37 °C (Figura 1C) e seccionada em numerosos fragmentos (Figura 1D). Em seguida, os fragmentos foram incubados na mesma solução por cinco minutos.

Figura 1. Transporte e processamento do complexo testículo-epidídimo.



(A) CTE em solução salina a 0,9%. (B) Separação da estrutura anatômica do epidídimo do testículo. (C) Estrutura anatômica do corpo e cauda do epidídimo. (D) Técnica de fatiamento da cauda do epidídimo. Fonte: Acervo do autor.

Em seguida, a amostra foi centrifugada a 500g por 6 minutos, resuspendida em tubo cônico de 2 mL contendo 300 µl de solução TRIS e avaliada. Apenas amostras com motilidade acima de 60 % e vigor igual ou superior a 3 foram utilizadas no presente estudo.

4.2. AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

As amostras espermáticas foram avaliadas quanto ao movimento, morfologia, viabilidade e funcionalidade da membrana plasmática e condensação da cromatina. A avaliação espermática ocorreu em três momentos durante o experimento: logo após a colheita, durante o resfriamento (4 °C) e após o descongelamento dos espermatozoides epididimários, exceto para análise da cinética espermática e de condensação da cromatina.

A avaliação da cinética do movimento espermático foi realizada a partir do sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis). Para isso 2µl da amostra espermática foi inserida em lâmina previamente aquecida a 37 °C. A avaliação no CASA aconteceu após a colheita e durante o resfriamento. O equipamento foi configurado para os padrões da espécie felina segundo proposto por VillaVerde (2007). Os parâmetros analisados foram: Motilidade total (MT); Velocidade Curvilínea (VCL); Velocidade Média da Trajetória (VAP); Velocidade Linear Progressiva (VSL); Linearidade (LIN); Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH); e Frequência do Batimento Flagelar (BCF) (MATOS et al., 2008).

Para avaliar a motilidade e o vigor foi utilizado uma gota de 5µl da amostra sobre uma lâmina pré-aquecida a 37 °C, esta foi levada a um microscópio e observada em uma ampliação de 100 a 400 vezes. Na motilidade, a amostra foi pontuada de 0 a 100% de acordo com o número de células móveis em relação ao total de espermatozoides presentes. Na avaliação do vigor, os espermatozoides foram classificados em uma escala 0 a 5, sendo 0 = parado, 1 = movimento sem sair do lugar; 2 = movimento circular, 3 = movimento retilíneo lento, 4 = movimento retilíneo rápido e 5 = movimento rápido e flechante (EMERENCIANO et al., 2013).

A concentração espermática foi determinada a partir da diluição de 5µl da amostra biológica com 95 µl de solução salina formolizada a 0,1% (1:10). A contagem procedeu em uma câmara hematómetrica com auxílio de microscópio, em aumento de 400 vezes, onde foram contados 25 quadrantes e o valor obtido multiplicado por 10^6 (MACENTE et al., 2012).

A funcionalidade da membrana foi avaliada a partir do teste hiposmótico. Para tanto uma alíquota de 5 µl foi incubada em meio de osmolaridade definida (150mM/L), durante 45 a 60 minutos a 37 °C e, posteriormente avaliada em microscópio (400X), onde realizou-se contagem aleatória de 100 espermatozoides com caudas enroladas ou não. O percentual de

espermatozoides com cauda enrolada foi considerado como apresentando funcionalidade preservada (EMERENCIANO et al., 2013).

Para o teste de análise da condensação da cromatina, foi adicionado em uma lâmina 10 µl da amostra, em seguida, foi realizado o esfregão da mesma. Posteriormente, realizou-se o procedimento de fixação: 1 minuto em solução de etanol e ácido acético (3:1); 3 minutos em solução de etanol 70%; e 25 minutos em solução de HCl (ácido clorídrico) 4M. Após a fixação, a lâmina foi lavada com água destilada e reservada para secar naturalmente. Em seguida, adicionou-se 5 µl do corante azul de toluidina (pH 4). A lâmina foi levada ao microscópio (400X) onde foram contados 500 espermatozoides corados (cromatinas condensadas) e não corados (cromatinas descondensadas) (KAMIMURA; JACOMINI; BELETTI, 2010).

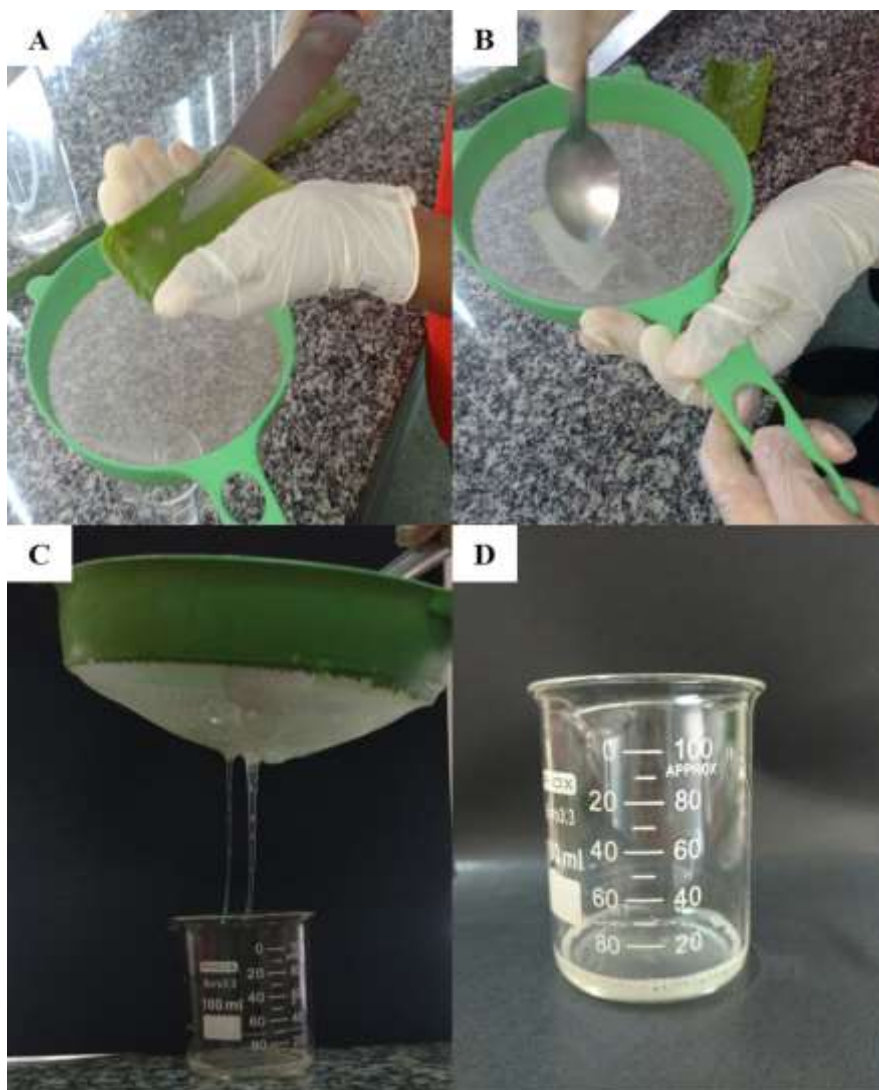
O teste da viabilidade dos espermatozoides consistiu na adição de 5 µl da amostra biológica em 5 µl do corante Azul de Bromofenol em uma lâmina, seguida da realização do esfregão. Foram contabilizadas 100 células com auxílio de microscópio (400x), sendo as mesmas classificadas em azuis (não viáveis) e brancas (viáveis) (DE OLIVEIRA et al., 2009).

A avaliação da morfologia espermática consistiu na realização de um esfregão contendo 5µl da amostra diluída em 45 µl de solução corante Rosa Bengala a 1,5%. Foram contados de forma aleatória 200 espermatozoides, normais e anormais, em microscópio com aumento de 400 vezes. As anormalidades espermáticas foram pontuadas em: defeitos na cabeça (macro e microcefalia, dupla, formato anormal, destacada), na peça intermediária (dobrada, quebrada, espessa, gota citoplasmática proximal ou distal) e na cauda (enrolada, fortemente enrolada, dupla, quebrada), podendo ser pontuada mais de uma anormalidade por célula espermática (RASKIN; MEYER, 2011).

4.3. CONFECÇÃO DO EXTRATO DE *Aloe vera*

A coleta da *Aloe vera* ocorreu no município de Mossoró- RN (05° 11' 15" S 37° 20' 39" W) em horário padronizado (entre 6h15min e 6h30min). Para obtenção do extrato bruto da *Aloe vera* foi realizada a retirada da camada externa do catafilo com auxílio de faca inox e, em seguida, à extração do parênquima da folha, de aspecto de gel incolor (Figura 2A; Figura 2B). O material obtido foi filtrado com o auxílio de uma peneira e colher inox (Figura 2C) e acondicionado em recipiente de vidro para posterior preparação das soluções diluentes (Figura 2D) (MELO, 2010).

Figura 2. Obtenção do extrato bruto de *Aloe vera*.



(A) Remoção do catafilo da folha. (B) Extração do parênquima. (C) Filtração do parênquima em peneira. (D) Acondicionamento do extrato bruto. Fonte: Arcevo do autor.

4.4. CRIOPRESERVAÇÃO

As amostras biológicas foram submetidas a três tratamentos (Controle, T10%, T20%). Todos submetidos à curva de congelação proposta por Cocchia et al. (2010). No controle, as amostras foram diluídas em solução TRIS acrescida de 20% de gema de ovo. Enquanto nos tratamentos T10% e T20% o lavado epididimário foi diluído em solução TRIS contendo 10% e 20% de *Aloe vera*, respectivamente.

De modo geral, o lavado epididimário foi fracionado em três tubos cônico plásticos de 2 mL e diluídos nas soluções dos respectivos tratamentos. Após a diluição, estes foram submetidos a 4 °C por 60 minutos. Durante o período de resfriamento a 4 °C, foi adicionada à amostra solução de mesma composição acrescida de glicerol, em uma concentração final de

4%. Logo em seguida, as amostras foram envazadas em palhetas francesas de 250 µl, lacradas com álcool *polivinílico* e expostas a vapores de nitrogênio (-70 °C) em artefato de isopor por 20 minutos, distando as palhetas 6 cm do nível de nitrogênio líquido. Ao fim deste período, as palhetas foram acondicionadas em botijão de nitrogênio a -196 °C (COCCHIA et al., 2010).

4.5. DESCONGELAÇÃO

A descongelação procedeu após o intervalo de uma semana. As palhetas foram imersas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. Posteriormente, as amostras foram transferidas para tubos plásticos de 2 ml equilibrados em temperatura ambiente e avaliados como descrito no tópico 3.2 (COCCHIA et al., 2010).

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos em média e desvio padrão e analisados através dos programas estatísticos BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007) e Statistica 8.0 (Statsoft INC, 2007). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, os valores foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os dados referentes ao vigor espermático foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CINÉTICA DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO

Os valores obtidos a partir do Sistema de Análise Computadorizada (CASA) foram expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da cinética do movimento espermático de gatos domésticos para amostras do lavado epididimário frescas e resfriadas para os tratamentos Controle, T10% e T20%.

Tratamento	MT (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Fresco	77,22 $\pm$ 9,60 ^a	66,02 $\pm$ 5,86	125,19 $\pm$ 12,42 ^a	45,96 $\pm$ 5,96	37,78 $\pm$ 3,80	6,80 $\pm$ 1,16	18,51 $\pm$ 1,97
Resfriado	Controle	73,33 $\pm$ 16,21 ^{aA}	70,74 $\pm$ 10,25	126,86 $\pm$ 15,58 ^{aA}	50,49 $\pm$ 10,51	41,11 $\pm$ 4,31	7,92 $\pm$ 1,25
	T10%	32,89 $\pm$ 25,18 ^{bB}	55,50 $\pm$ 23,16	94,10 $\pm$ 36,61 ^{bB}	40,34 $\pm$ 19,93	38,78 $\pm$ 17,39	6,11 $\pm$ 5,32
	T20%	48,00 $\pm$ 22,85 ^{aAB}	61,90 $\pm$ 24,99	104,49 $\pm$ 41,89 ^{aAB}	45,99 $\pm$ 19,43	39,56 $\pm$ 16,59	6,78 $\pm$ 3,17

T10%: concentração de *Aloe vera* a 10%; T20%: concentração de *Aloe vera* a 20%; Controle: 20% de gema de ovo; MT: Motilidade Total; VAP: Velocidade Média da Trajetória; VCL: Velocidade Curvilínea; VSL: Velocidade Linear Progressiva; LIN: Linearidade; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça; BCF: Frequência do Batimento Flagelar. a, b, c: letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes entre grupos comparados (Fresco e Resfriado); A, B, C: letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes entre os tratamentos comparados (controle, T10% e T20%). Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Pode-se perceber que a Motilidade total do controle resfriado e do tratamento T20% não diferiu ($p > 0,05$) da amostra fresca; diferente do observado no tratamento T10%. De modo geral, os crioprotetores extracelulares atuam promovendo uma desidratação controlada das células e consequentemente, a redução da formação dos cristais de gelo intracelulares; além disso, estes crioprotetores interagem com os fosfolípidios da membrana plasmática do espermatozoide, reorganizando-os e aumentando a capacidade de sobrevivência da célula (SILVA; GUERRA, 2011). Acredita-se então que o resultado obtido nesse trabalho está relacionado ao menor percentual de crioprotetor extracelular empregado, visto que no tratamento T20% e no controle foram utilizadas concentrações de 20%. Possivelmente, em concentrações similares ou maiores, os polissacarídeos presentes na *A. vera* atuem de modo tão eficiente como a gema de ovo.

Em relação à Motilidade Total no resfriamento, o tratamento T10% apresentou-se diferente do controle ($p > 0,05$). Entretanto, o tratamento T20% apresentou-se semelhante (p

> 0,05) ao controle e ao T10%. A semelhança entre os tratamentos que utilizam a *A. vera* pode estar relacionada às características físico-químicas do extrato vegetal e aos seus mecanismos de proteção da célula espermática, que se dá pela presença de polissacarídeos e saponinas, substâncias que estão intimamente relacionadas à ação crioprotetora da *A. vera* (MELO, 2010; VARGAS, 2012).

A avaliação da motilidade das amostras espermáticas é de extrema importância, visto que está intimamente relacionada com a capacidade de fecundação da célula (MELO, 2010). No presente estudo, a motilidade para o lavado epididimário fresco variou de 60 a 80%, sendo esses valores superiores aos relatados na literatura no qual variaram de 50% a 75% (JIMÉNEZ et al., 2011; MACENTE et al., 2012; JIMÉNEZ et al., 2013; LIMA et al., 2015). Para motilidade de espermatozoides resfriados é relatado valor de $67,5 \pm 13,1\%$ (MACENTE et al., 2012). Apenas o tratamento controle obteve resultado semelhante aos encontrados na literatura, apresentando valores de motilidade entre 63 – 95%.

Em relação ao parâmetro VCL (velocidade curvilínea), foi observada diferença ($p < 0,05$) entre o tratamento T10% quando comparado com a amostra fresca. Esse mesmo tratamento também diferiu ($p < 0,05$) dos demais durante o resfriamento. Já o tratamento T20% foi semelhante ($p > 0,05$) ao controle e ao T10% no grupo resfriado. O VCL é um indicativo da capacidade fecundante do espermatozoide, visto que determina a distância total percorrida pela célula entre os intervalos de captura da imagem; assim, espermatozoides que apresentam valores elevados de VCL estão aptos a serem empregadas em biotécnicas reprodutivas como a Produção *in vitro* de embriões (MATOS et al., 2008). Os valores de VCL obtidos nesse estudo tanto da amostra fresca quanto a resfriada, para ambos os tratamentos, foram superiores a estudos para espermatozoides epididimários (LIMA et al., 2015).

Para os parâmetros Velocidade média da trajetória (VAP), Velocidade linear progressiva (VSL), Linearidade (LIN), Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) e Frequência do batimento flagelar (BCF) não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos e tempos de avaliação. Os valores obtidos nesse estudo foram semelhantes aos observado por outros autores para a espécie felina doméstica (LIMA et al., 2015).

A interpretação das variáveis obtidas pelo CASA é fundamental para determinar os índices de fertilidade de uma dada amostra espermática (ARRUDA et al., 2011). Embora o sistema CASA permita o monitoramento da qualidade espermática, as análises estão sujeitas a influências da metodologia, da experiência do observador, da concentração espermática e da frequência de aquisição de imagens (MATOS et al., 2008). Sendo assim, é importante a padronização da análise da amostra e da configuração para a espécie. Também é necessário

associar os resultados obtidos pelo CASA com outras avaliações, tais como testes de integridade da membrana plasmática, do acrossoma e do DNA e às taxas obtidas em biotécnica reprodutivas, como Inseminação Artificial, Produção *In Vitro* de Embriões e Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

5.2. MOTILIDADE, VIGOR, INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA E CONDENSAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA

Os valores para as avaliações de motilidade, vigor, viabilidade, funcionalidade da membrana plasmática e condensação da cromatina foram expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Características das amostras espermáticas oriundas do epidídimo de gato doméstico por grupos (Amostra Fresca, Amostra Resfriada e Amostra Descongelada) e tratamentos (Controle, T10% e T20%) para as variáveis de motilidade, vigor, funcionalidade de membrana, integridade de membrana e condensação da cromatina.

Tratamento	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	HOST (% membranas funcionais)	Viabilidade (%membranas íntegras)	Cromatinas condensadas (%)	
Fresco	72,78 ± 8,70 ^a	3,67 ± 0,50 ^a	73,89 ± 12,40 ^a	59,33± 10,16 ^a	99,80 ± 0,24	
Resfriado	Controle	59,44 ±8,82 ^{aA}	3,22 ± 0,44 ^{aA}	64,44 ± 0,16 ^{aA}	49,89 ± 10,73 ^{aA}	-
	T10%	48,33 ±7,85 ^{aA}	2,33 ± 1,12 ^{bA}	49,78±15,01 ^{aA}	23,89 ± 14,30 ^{bB}	-
	T20%	48,33±20,31 ^{aA}	2,56 ± 1,01 ^{bA}	55,78 ± 5,33 ^{aA}	23,67 ± 14,70 ^{bB}	-
Descongelado	Controle	36,33±11,28 ^{bA}	3,22 ± 0,44 ^{aA}	52,89 ± 6,49 ^{aA}	35,56 ± 8,31 ^{aA}	99,76 ± 0,44
	T10%	12,78 ± 7,95 ^{bB}	1,78 ± 1,20 ^{bB}	35,56 ± 3,21 ^{bB}	17,44 ± 8,28 ^{bB}	99,84 ± 0,22
	T20%	22,78±16,03 ^{bAB}	2,11 ± 1,36 ^{bB}	41,00±10,84 ^{bB}	22,22 ± 9,50 ^{bB}	99,98 ± 0,07

T10%: concentração de *Aloe vera* a 10%; T20%: concentração de *Aloe vera* a 20%; Controle: concentração de gema de ovo a 20%. a, b, c: letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes entre grupos comparados (Fresco, Resfriado e Descongelado); A, B, C: letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes entre os tratamentos comparados (controle, T10% e T20%). Teste de Kruskal-Wallis (motilidade, HOST, viabilidade e cromatinas condensadas) e teste de Mann-Whitney (vigor) ($p < 0,05$).

Os resultados de motilidade não divergiram ($p > 0,05$) entre a amostra fresca e as amostras resfriadas tanto para controle como para os tratamentos T10% e T20%. Já após a descongelação, houve diferença ($p < 0,05$) entre o grupo descongelado e amostras fresca. Na literatura, os valores de motilidade após a descongelação variam de 20 – 40% para

espermatozoides epididimários (COCCHIA et al., 2010; MACENTE et al., 2012; KUNKITTI et al., 2016). O valor observado no grupo controle desse estudo encontra-se dentro dos limites relatados na literatura, diferente do observado para os tratamentos T10% e T20%.

Quando comparados os tratamentos, no grupo descongelado, observou-se um decaimento da motilidade do tratamento T10% em relação ao controle. Já o tratamento T20% não apresentou diferença ($p > 0,05$) quando comparado ao controle, indicando o possível efeito benéfico de maiores concentrações de *A. vera* na manutenção da motilidade espermática após a descongelação, embora o mesmo também tenha sido semelhante ($p > 0,05$) ao tratamento T10%.

O declínio da motilidade durante a criopreservação é previsto devido ao estresse osmótico que as células espermáticas são submetidas durante a congelação (MACENTE et al., 2012). Adicionalmente, a criopreservação de espermatozoides epididimários apresenta resultados inferiores aos observados com sêmen (CHATDARONG et al., 2010; COCCHIA et al., 2010; ZAMBELI et al., 2010; MACENTE et al., 2012; KUNKITTI et al., 2016). Esses resultados podem estar associados à função de determinados constituintes do plasma seminal, como proteínas do choque térmico HSP70, lactotransferrinas e fosfolipases A2, que conferem maior termoresistência aos espermatozoides e auxiliam na redução do estresse oxidativo (BEZERRA et al., 2013).

Em estudos anteriores, foram demonstrados que espermatozoides do sêmen foram significativamente melhores, quanto à motilidade, integridade da membrana e do acrossoma, em comparação com os espermatozoides oriundos do epidídimo, em teste de tolerância ao choque frio sob adição de gema de ovo (HERMANSSON; AXNE, 2007). Contudo, Tebet (2004) relatou que células espermáticas oriundas do ejaculado e do epidídimo não apresentaram divergências na motilidade e vigor após a criopreservação, porém, os espermatozoides epididimários foram mais suscetíveis a lesões severas na integridade do acrossoma.

A redução da motilidade espermática após a descongelação também pode ser explicada pela ação tóxica que o glicerol apresenta em contato com células na temperatura ambiente, interferindo negativamente na motilidade e viabilidade celular. Chatdarong et al. (2010) propuseram a diluição dos espermatozoides descongelado em tampão TRIS como método de redução dos efeitos tóxicos dos crioprotetores, conseguido aumentar a motilidade para $64,2 \pm 10,4\%$.

Quanto ao vigor, o valor apresentado no estudo para amostra fresca, no intervalo de 3 e 4, condiz com valores presentes na literatura para espermatozoides oriundos do epidídimo

(EMERENCIANO et al., 2013; LIMA; 2015; MACENTE, 2012). Durante o resfriamento, observou-se decaimento do vigor nos tratamentos T10% e T20%. O mesmo foi observado para as amostras descongeladas. Também foi observado que os tratamentos T10% e T20% diferiram ($p < 0,05$) quando comparados com o controle no grupo descongelado. Portanto, os resultados indicam que a *Aloe vera* não foi eficiente em manter o vigor espermático após descongelação.

A partir do teste de viabilidade da membrana foram obtidos valores de membranas íntegras de $59,33 \pm 10,16\%$ para os espermatozoides frescos; estes valores se apresentaram dentro do intervalo de viabilidade (41,7% a 74,3%) descrito na literatura (COCCHIA et al., 2010; EMERENCIANO et al., 2013). No resfriamento observou-se um declínio na integridade das membranas no tratamento T10% e T20% para $23,89 \pm 14,30\%$ e $23,67 \pm 14,70\%$, respectivamente. O mesmo foi observado para as amostras descongeladas, $17,44 \pm 8,28\%$ para T10% e $22,22 \pm 9,50\%$ para T20%. É relatado valores de viabilidade espermática entre 33,5% – 63,9% para espermatozoides epididimários criopreservados (TEBET, 2004, MARTINS, 2006, HERMANSSO; AXNE, 2007, COCCHIA et al., 2010, CHATDOARONG; THUWANUT; MORRELL, 2010; MACENTE, 2014, KUNKITTI et al., 2016), apenas o tratamento controle ($35,56 \pm 8,31\%$) encontrou-se dentro dos valores do intervalo.

A integridade da membrana é fundamental para que o espermatozoide consiga interagir/reconhecer o oócito na fecundação. Sabe-se que a criopreservação promove uma modificação na fluidez da membrana plasmática decorrente das interações moleculares dos fosfolipídios com o crioprotetor (SILVA; GUERRA, 2011). Além disso, ocorre um fenômeno de translocação dos fosfolipídios entre o folheto externo e o interno da bicamada lipídica, que torna o espermatozoide aparentemente capacitado (SILVA; GUERRA, 2011). Cocchia et al. (2010) descreve que os espermatozoides podem também sofrer uma reação acrossômica prematura devido a modificação da permeabilidade da membrana plasmática aos íons de cálcio e por consequência, os valores de viabilidade dos espermatozoides criopreservados serem inferiores.

A manutenção da viabilidade durante a criopreservação só foi observado para o tratamento com gema de ovo a 20%; possivelmente esse resultado se deve aos mecanismos de ação da gema, que além de promover a estabilização das membranas repõem os fosfolipídios que as compõem (MELO, 2010). Já os tratamentos que empregaram *A. vera* apresentaram redução progressiva da viabilidade durante o resfriamento e após a descongelação, indicando

que as interações entre os polissacarídeos e a membrana plasmática não foram eficientes na proteção contra as crioinjúrias.

Na realização do teste hiposmótico observou-se que todos os tratamentos (controle, T10%, T20%) mantiveram a funcionalidade da membrana durante o resfriamento. Entretanto ocorreu um declínio nos valores de T10% e T20% após a descongelação, sendo esses valores diferentes ($p < 0,05$) dos observados no grupo controle. Os valores de funcionalidade de membrana obtidos neste estudo em todos os tratamentos e tempos encontram-se dentro do intervalo relatado na literatura (MACENTE, 2014; LIMA et al., 2015).

A funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide está associada a sua integridade, podendo ser um indicador de fertilidade, visto que a viabilidade da membrana é um requisito para que ocorra a fertilização (BITTENCOURT et al., 2006). O padrão de resultado obtido pelo teste hiposmótico assemelha-se aos valores para o parâmetro da viabilidade, onde apenas o controle manteve-se ideal após a descongelação. Possivelmente, a *Aloe vera* não é eficiente na promoção da proteção da membrana plasmática, vistos os baixos índices de reatividade ao HOST pelos espermatozoides que foram criopreservados com esta solução.

A análise da integridade da cromatina foi realizada apenas nas amostras frescas e descongeladas, visto que a variação observada na literatura é mínima para outras espécies e entre os momentos/períodos/curva de congelação utilizadas. Nos valores de condensação de cromatina não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os espermatozoides antes e após a criopreservação, indicando que *A. vera* não altera de maneira significativa a integridade da cromatina durante o congelamento. A cromatina é constituída pelo ácido desoxirribonucleico (DNA) associado a proteínas e a uma pequena quantidade de ácido ribonucleico (RNA), localizada no interior do núcleo da célula. Sabe-se que a condensação da cromatina dos espermatozoides inicia nos testículos e continua durante sua passagem pelo epidídimo. O grau de compactação da cromatina espermática é importante para a preservação do material genético e transmissão das características genéticas para prole (NAVA-TRUJILLO; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; QUINTERO-MORENO, 2012, KUNKITTIN et al., 2016). Kunkittin et al. (2016) relata que a cromatina dos espermatozoides do gato doméstico apresenta um bom grau de estabilidade e tolerância a crioestresses quando comparado a células espermáticas de humano, equino e canino.

5.3. MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

O percentual de células espermáticas com morfologia normal e a classificação dos defeitos morfológicos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Morfologia e classificação dos defeitos espermáticos de gatos domésticos avaliados em diferentes momentos (Amostra Fresca, Amostra Resfriada e Amostra Descongelada) e tratamentos (Controle, T10% e T20%).

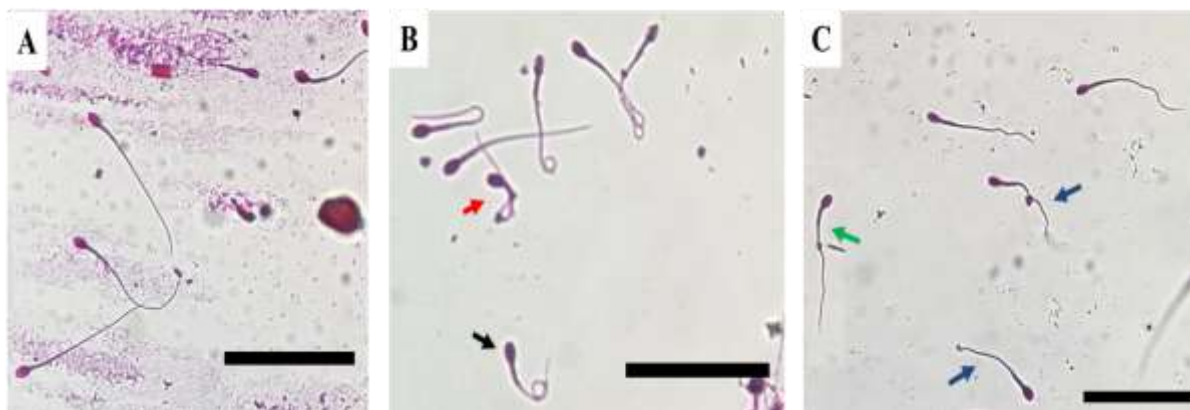
Tratamento		Morfologia (% Células normais)	AC %	AP%	AK%
Fresco		41,89 ± 11,50 ^a	89,46 ± 6,22 ^a	7,95 ± 5,33 ^a	2,59 ± 2,47 ^a
Resfriado	Controle	40,17 ± 5,37 ^{aA}	90,06 ± 2,04 ^{aA}	7,79 ± 3,19 ^{aA}	2,15 ± 1,59 ^{aA}
	T10%	38,28 ± 9,64 ^{aA}	91,05 ± 4,88 ^{aA}	6,27 ± 3,57 ^{aA}	2,68 ± 3,11 ^{aA}
	T20%	37,44 ± 4,97 ^{aA}	92,41 ± 4,04 ^{aA}	5,48 ± 2,23 ^{aA}	2,11 ± 2,19 ^{aA}
Descongelado	Controle	40,67 ± 6,93 ^{aA}	97,74 ± 1,65 ^{ba}	1,78 ± 1,67 ^{aA}	0,48 ± 0,09 ^{aA}
	T10%	35,89 ± 7,80 ^{aA}	94,39 ± 6,10 ^{aA}	2,03 ± 1,61 ^{ba}	3,58 ± 6,56 ^{aA}
	T20%	35,83 ± 7,79 ^{aA}	95,14 ± 3,01 ^{aA}	2,76 ± 1,96 ^{aA}	2,10 ± 2,55 ^{aA}

T10%: concentração de *Aloe vera* a 10%; T20%: concentração de *Aloe vera* a 20%; AC: Anormalidade de cauda; AP: Anormalidade na peça intermediária; AK: Anormalidade de cabeça. a, b, c: letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes entre grupos comparados (Fresco, Resfriado e Descongelado); A, B, C: letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes entre os tratamentos comparados (controle, T10%, e T20%). Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

No presente estudo, a porcentagem de espermatozoides epididimários normais foi inferior aos valores apresentados na literatura para amostras espermáticas consideradas normais (FLORIANO, 2011). Apenas dois de dez lavados epididimários coletados no presente estudo apresentaram morfologia normal, com cerca de 58,5% e 54% de normalidade (Figura 3). Não foram observadas divergências ($p > 0,05$) entre os tratamentos ou entre o resultado fresco, resfriado e descongelado. Dentre as anormalidades quantificadas, os defeitos de cauda foram os mais presentes, seguido dos defeitos de peça intermediária e cabeça.

A análise morfológica é um importante parâmetro para determinar a qualidade da amostra espermática e, conseqüentemente, a fertilidade do macho; principalmente, nos indivíduos da família *Felidae*, que são acometidos de um elevado índice de anormalidade (LEITE, 2009). Segundo Swanson et al. (2003), das 37 espécies de felinos, 28 são classificadas como teratozoospermicas, incluindo o gato doméstico.

Figura 3. Morfologia dos espermatozoides epididimários frescos de gatos domésticos.



(A) Lavado epididimário normoespérmicos, com 58,5% de células morfolologicamente normais, visualizado em microscópio (400X). (B) e (C) Lavado epididimário teratospérmicos, com 32% e 48,5% de células morfolologicamente normais, respectivamente, visualizadas em aumento de 400X. As setas indicam as alterações morfológicas nas células espermáticas, sendo preta para alterações de cauda enrolada; azul para cauda quebrada; vermelha para peça intermediária quebrada; e verde para peça intermediária dobrada. Coloração: Rosa Bengala (1,5%). Barra de escala: 50µm. Fonte: Acervo do autor.

Espermatozoides de animais teratozoospérmicos possuem capacidade reduzida de sofrer capacitação no trato reprodutor da fêmea, de penetração na zona pelúcida e de sofrer reação acrossômica. Além disso, é sabido que estes são mais sensíveis ao processo de criopreservação, inviabilizando, muitas vezes, a execução da biotécnica (LEITE, 2009). Segundo Pukazhenthi et al. (2001), os principais defeitos presentes nos espermatozoides de felinos teratozoospérmicos são os de peça intermediária dobrada, cauda dobrada, cauda fortemente enrolada e defeitos de acrossoma.

No presente estudo, as alterações observadas com maior frequência foram a cauda dobrada e/ou enrolada e a peça intermediária dobrada. Essas deformações morfológicas estão associadas a defeitos secundários, possivelmente causados durante o armazenamento e maturação no epidídimo, ou podem também ser ocasionados durante a manipulação da amostra (FLORIANO, 2011).

Foi observado que ocorreu um aumento entre os valores dos defeitos de cauda dos espermatozoides frescos em relação aos descongelados do grupo controle. Isso pode ser explicado por possível aglutinação da gema de ovo na estrutura da cauda promovendo deformidades (VILLAYERDE et al., 2008). Os defeitos nos flagelos também podem ser resposta de um possível choque térmico e/ou osmótico durante o processo de criopreservação, principalmente na descongelação que é uma fase crítica, responsável por maior parte das lesões as células espermáticas (TEBET, 2004).

Também foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre o fresco e o descongelado para o tratamento T10% na quantificação dos defeitos de peça intermediária. Esse resultado é similar aos achados de Maciel-Melo et al. (2015) que observaram redução do número de espermatozoides normais nos tratamentos contendo *A. vera* a 5% (79,71%) e 10% (80,64%) em relação ao controle, com apenas DMSO, (86,36%), para o tambaqui.

A qualidade das amostras espermáticas está relacionada a fatores genéticos, nutricionais e ambientais. Sabe-se que a teratozoospermia está intimamente relacionada à baixa variabilidade genética dos felinos. Entretanto alguns desses defeitos podem ser expressos nos espermatozoides apenas temporariamente e, portanto, não implicam na infertilidade do felino. Além disso, acredita-se que a teratozoospermia é compensada pela maior produção de espermatozoides (MORAIS et al., 2002; PUKAZHENTHI et al., 2006).

NEUBAUER et al. (2004) propuseram a avaliação histomorfológica e a quantificação populacional das células espermáticas por citometria de fluxo em gatos domésticos normoespérmicos e teratozoospérmicos, obtendo resultados de volume testicular maior para os machos teratozoospérmicos quando comparado com os normoespérmicos. Também foram reveladas maiores quantidades de células espermátogênicas ($184,3 \pm 8,3$ para animais teratospérmicos e $117,6 \pm 8,4$ para normoespérmicos) por túbulo e, menor número de células de Sertoli por unidade de tecido ($13,7 \pm 0,3$ e $19,4 \pm 1,1$ para teratospérmicos e normoespérmicos, respectivamente).

Espermatozoides teratozoospérmicos são mais suscetíveis a danos na membrana induzidos pelo resfriamento durante o processo de criopreservação (TEBET, 2004). Pukazhenthhi et al. (1999) relataram a comparação de populações de espermatozoides normais e anormais, obtendo para amostras normoespérmicas uma redução da integridade do acrossoma de $75,5 \pm 5\%$ para $64,7 \pm 7,7\%$; enquanto que para os espermatozoides teratozoospérmicos foi de $68,3 \pm 3,9\%$ para $56,8 \pm 3,6\%$. Possivelmente a maior sensibilidade ao resfriamento/congelamento deve-se a diferenças na composição e/ou estrutura dos fosfolipídios da membrana plasmática dos espermatozoides anormais, que poderia influenciar nas propriedades de fluidez e características de transição de fase. Em humanos inférteis, já é sabido que as células espermáticas apresentam maior quantidade de colesterol e isso está relacionado a uma capacitação mais lenta (HOSHI et al., 1990). Portanto, os resultados apresentados no estudo podem ser otimizados em amostras biológicas com maior população de espermatozoides normais.

5.4. PERSPECTIVAS DA APLICAÇÃO DA *Aloe vera* NA CONSERVAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES

Diversos trabalhos propuseram a aplicação do extrato da *A. vera* na conservação de espermatozoides oriundos do ejaculado e do epidídimo de inúmeras espécies domésticas (MELO, 2010; AGUIAR et al., 2012; CÂMARA et al., 2012; FARIAS et al., 2012; VARGAS, 2012; DE MELO, 2015; MELO-MACIEL et al., 2015; SOUZA et al., 2016). Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que realizou a congelação dos espermatozoides epididimários de felino doméstico utilizando a *A. vera*.

A partir dos resultados expostos pode-se perceber que a *A. vera* não permitiu a conservação da motilidade espermática após a criopreservação. Embora os resultados não tenham sido satisfatório para a espécie felina, a *A. vera* apresenta em sua composição outras substâncias que podem ser exploradas com a finalidade de impedir possíveis contaminações microbiológicas, como as antraquinonas, saponinas e fenóis; bem como, substâncias que podem ser utilizada para minimizar o estresse oxidativo das células espermáticas e auxiliar na manutenção da qualidade do seu movimento, tais como a vitamina E (MELO, 2010; SOUZA et al., 2016).

Além disso, foi notado durante a execução do experimento que as amostras criopreservadas com *A. vera* apresentaram aspecto mais dessujo (claro), facilitando a visualização e manipulação posterior. Diante disso, o emprego da *A. vera* permitiria a utilização dos espermatozoides na Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE).

Em outros estudos que utilizaram a *A. vera* percebeu-se que concentrações menores conferiam maiores vantagens (MELO, 2010; MELO-MACIEL et al., 2015) diferentemente do observado em nosso estudo. Entretanto deve-se considerar que o extrato vegetal está sujeito a variações ambientais de clima e solo, que afetam diretamente a composição do parênquima da planta (MELO, 2010). Além disso, a necessidade da célula espermática e/ou sensibilidade difere para cada espécie animal, o que faz necessário o desenvolvimento de diluentes e meios crioprotetores específicos para manutenção da motilidade dos espermatozoides após a criopreservação.

Acredita-se que a padronização da *A. vera* a partir de formulações liofilizadas e bioquimicamente caracterizadas permita a conservação dos seus constituintes (e/ou princípio ativo) de maneira mais adequada e conseqüentemente, a utilização da *A. vera* em diversos outros protocolos de criopreservação (FREITAS; RODRIGUES; GASPI, 2014).

6. CONCLUSÃO

O extrato bruto de *A. vera* adicionado ao meio diluidor TRIS, nas concentrações de 10% e 20%, não permitiu a manutenção do movimento e da integridade e funcionalidade da membrana dos espermatozoides criopreservados.

Contudo, como esse trabalho é pioneiro no emprego da *A. vera* na criopreservação dos espermatozoides epididimários de felinos domésticos, se faz necessário outros estudos sobre o efeito de concentrações mais elevadas visando o desenvolvimento de protocolos de criopreservação para felinos que obtenham bons resultados nas amostras descongeladas.

7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. V. et al. Adição de *Aloe vera* ao diluente a base de água de coco em pó (ACP-101®) como crioprotetor do sêmen caprino resfriado a 4 °C. In: VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, 2012.
- ANGRIMANI, D. S. R. et al. Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 4, p. 323-327.
- ARAUJO, G.R. **Coleta farmacológica e criopreservação de sêmen de grandes felinos, mantidos em cativeiro e capturados em vida livre com o uso de armadilhas de laço**. 2016. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2016.
- ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 35, p. 145-151, 2011.
- BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.4, p.400-407, 2011.
- BENCHARIF, D. et al. The Advantages of Combining Low-Density Lipoproteins with Glutamine for Cryopreservation of Canine Semen. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 2, p. 189-200, 2010.
- BEZERRA, R. Q. J. et al. Eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa como ferramenta proteômica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 100-112, 2013.
- BITTENCOURT, R. F. et al. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 213-218, 2006.
- BITTENCOURT, R. F. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 522-536, 2013.
- BONAURA, M. C. et al. Alteraciones Ultramicroscópicas Observadas en Espermatozoides Felinos (*Felis catus*) Congelados-Descongelados/ultramicroscopic Changes Observed in Sperm Cats (*Felis catus*) Frozen-thawed. **Revista Ciencias Morfológicas**, v. 15, n.2, 2013.

CÂMARA, T. S. et al. Avaliação do efeito crioprotetor da Aloe vera no congelamento do sêmen ovino. In: VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, 2012.

CASTRO, S. V. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.

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.

CHATDARONG, K. et al. Effects of Thawing Temperature and Post-thaw Dilution on the Quality of Cat Spermatozoa. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 2, p. 221-227, 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.

COCCHIA, N. et al. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. **Zygote**, v. 18, n. 01, p. 1-8, 2010.

DECO-SOUZA, T. et al. Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 512-516, 2013.

CASTELO, T. S; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.

DI DOMENICO, D.; PEDROSO, E. M. S. R.; TEIXEIRA, P. P. M.. Diferenças da célula espermática suína e crioprotetores: Revisão. **Nucleus Animalium**, v. 7, n. 1, 2015.

DOMINGOS, T. C. S.; SALOMÃO, M. C. Meios de diagnóstico das principais afecções testiculares em cães: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 393-399, 2011.

ERDMANN, R. H. et al. Contenção farmacológica da jaguatirica, *Leopardus pardalis*, para coleta de sêmen, pela associação de tiletamina-zolazepam e xilazina= Chemical restraint of

ocelot, *Leopardus Pardalis*, for semen collection with the association of tiletamine-zolazepam. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, 2013.

EMERENCIANO, K. D. M. et al. Recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*) utilizando soluções à base de tris ou água de coco em pó. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 148-153, 2013.

FARIAS, P. P. Q. et al. Kinetics parameters of ram spermatozoa extended in powder coconut water solution (ACP-102) added with Aloe vera or egg yolk. In: **Ciência Animal**. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinaria, 2012. p. 451-453.

FERREIRA, J. C. P.; FILHO, W. C. M.; FUGIHARA, C. J. INDICADORES DE BEM-ESTAR EM TOUROS SUBMETIDOS À COLHEITA DE SÊMEN POR ELETROEJACULAÇÃO. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 52-63, 2012.

FILLIERS, M. et al. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two collection techniques. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 31-39, 2010.

FLORINDO, J. R. A. **Estudo comparativo das características de sêmen fresco de gatos domésticos, recolhido por cateterização uretral e a partir do epidídimo, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes**. 2011. Tese (Mestrado integrado em medicina veterinária) - UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA - Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2011.

FREITAS, V. S.; RODRIGUES, R. A. F.; GASPI, F. O. G. Propriedades farmacológicas da Aloe vera (L.) Burm. F. **Rev. Bras. Plantas Med**, v. 16, n. 2, p. 299-307, 2014.

GOODROWE, K.L.; HAY, M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididimal spermatozoa. **Theriogenology**, v.40, p.967-975, 1993.

GOULETSOU, P. G. et al. Impact of Fine-or Large-Needle Aspiration on Canine Testes: Clinical, In Vivo Ultrasonographic and Seminological Assessment. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, n. 4, p. 712-719, 2011.

HARTWIG, F. O. P.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA, J.A.J. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozóides na espécie equina: uma revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p. 157-168.

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, n. 7, p. 1239-1248, 2007.

HOSHI, K. et al. Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relationship with capacitation. **Human Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 71-74, 1990.

HUSSAIN, S. A.; LESSARD, C.; ANZAR, M. Quantification of damage at different stages of cryopreservation of endangered North American bison (*Bison bison*) semen and the effects of extender and freeze rate on post-thaw sperm quality. **Animal reproduction science**, v. 129, n. 3, p. 171-179, 2011.

IUCN 2015. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Acesso em: **16 de maio de 2016**.

IVIS: International Veterinary Information Service. <www.ivis.org> Acesso em: **27 de maio de 2017**.

JEYENDRAN, R.S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

JIMÉNEZ, E. et al. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. **Animal reproduction science**, v. 123, n. 3, p. 265-269, 2011.

JIMÉNEZ, E. et al. Effect of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 4, p. 665-672, 2013.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders Company, 2001.

KAMIMURA, C. F.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado de acridina. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 212-219, 2010.

KUNKITTI, P. et al. *In vitro* fertilization using frozen-thawed feline epididymal spermatozoa from corpus and cauda regions. **Theriogenology**, v. 86, p. 1403-1408, 2016.

LEITE, D. K. V. H. **Avaliações das características histológicas, citológicas, clínicas e seminais de felinos domésticos (*Felis catus*, Linnaeus, 1758) e selvagens (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775), *Leopardus geoffroyi*, D’Orbign & Gervais, 1843 e *Puma yagouaroundi*, E. GEOFFROYI, 1803). *FELIDAE CARNIVORA***. 2009. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro, 2009.

LUEDERS, I. et al. Improved semen collection method for wild felids: Urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Pantheraleo*). **Theriogenology**, 2012; 78, 696–701.

LIMA, D. B. C. et al. Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 873-881, 2016.

LUVONI, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 101-111, 2006.

MACENTE, B. I. et al. Congelação de espermatozoides epididimários de gatos utilizando o diluidor Botu-crio® após refrigeração por 24 h em contêiner de transporte de sêmen Botu-tainer®. **Acta Veterinaria Brasilica**, p. 112-117, 2012.

MACENTE, Beatrice Ingrid. **Congelação de células espermáticas provenientes de epidídimo de gatos domésticos contendo antioxidante no meio diluidor**. 2014. Tese (Título de Mestre em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal, São Paulo, 2014.

MARTINS, J. L. A. **Criopreservação de sêmen do epididimo de gatos domésticos (*Felis catus*) após refrigeração por 24 horas**. 2006. Tese (Título de Mestre em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” - Campus de Botucatu. Botucatu, São Paulo, 2006.

MARTINS, M. I. M.; JUSTINO, R. C. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 129-135. 2015.

MATOS, D. L. et al. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MELO, Cibele Cavalcanti Souza. **CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO A 4°C UTILIZANDO ACP-101® COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE *Aloe vera* OU GEMA DE OVO**. 2010. Tese (Mestrado em Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza, Ceará, 2010.

MELO, C. C. S. **Avaliação da eficácia dos diluidores tris ou água de coco em pó (ACP-106®), associado à *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller), na conservação de sêmen canino**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia pela RENORBIO) – Universidade Federal Rural do Pernambuco. Recife, Pernambuco, 2015.

MELLO, M. I. Perspectivas da aplicação comercial de biotecnologias envolvendo espermatozoides obtidos de epidídimo de cães e gatos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1 p.115-118, 2007.

MELO-MACIEL, M. A. P. et al. *Aloe vera* in the cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) sperm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 945-949, 2015.

MOREIRA, N. Exame andrológico e criopreservação de sêmen em felídeos selvagens. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.312-315, 2017.

MORAIS, R. N. et al. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2027-2041, 2002.

NEUBAUER, K. et al. Quantity Rather Than Quality in Teratospermic Males: A Histomorphometric and Flow Cytometric Evaluation of Spermatogenesis in the Domestic Cat (*Felis catus*) 1. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1517-1524, 2004.

NAVA-TRUJILLO, H.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, A.; QUINTERO-MORENO, A. Integridad de la cromatina y forma de la cabeza del espermatozoide de toro: evaluación simultánea con la tinción de azul de toluidina. **Revista Científica**, v. 22, n. 003, 2012.

OLIVEIRA, R.V. et al. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 862-869, 2009.

PAZ, R. C. R., LEME, D. P., ZÜGE, R. M., PESSUTI, C., SANTOS, E. F., BARNABE, R. C. Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), em testículo de onça pintada (*Panthera onça*), utilizada como ferramenta no diagnóstico de infertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 100-107, 2003.

PLATZ, C. C.; WILDT, D. E.; SEAGER, S. W. J. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**, v. 52, n. 2, p. 279-282, 1978.

PROCHOWSKA, S.; NIZANSKI, W.; OCHOTA, M.; PARTYKA, A. Effect of dilution rate on feline urethral sperm motility, viability, and DNA integrity. **Theriogenology**, 2014; 82 1273–1280.

PUKAZHENTHI, B. et al. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 1, p. 135-141, 1999.

PUKAZHENTHI, B.S., WILDT, D.E., HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, v.57, p.423-33, 2001.

PUKAZHENTHI, B. et al. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 112-121, 2006.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Citologia Clínica de Cães e Gatos: Atlas Colorido e Guia de Interpretação**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2011.

RODRIGUEZ, F. et al. Cervical versus intrauterine insemination of ewes using fresh or frozen semen diluted with aloe vera gel. **Theriogenology**, v. 30, n. 5, p. 843-854, 1988.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Aspectos fundamentais da morfofisiologia e criopreservação espermática em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.3, p.181-187, 2012

SILVA, T.F.P. et al. Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>.

SILVA, T. F.P. **Avaliação Andrológica, Métodos de Coleta e Tecnologia do Sêmen de Gatos Domésticos utilizando água de coco e Pó (acp-117®)**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Ceará, 2008.

SILVA, A. R. et al. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, n. 2, p. 219-234, 2012.

SILVA, T. F. P.; ACKERMANN, C. L.; SILVA, L. D. M. DESAFIOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA DA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN FELINO. In: VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, 2012, Fortaleza, CE, Brasil.

SILVA, L. D. M.; MOTA-FILHO, A. C. RECUPERAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE MAMÍFEROS. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2012.

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

SOUZA, A. L. P.; LIMA, G. L.; SILVA, A. R. Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 98-102, 2014.

SOUZA, A. L. P. et al. Use of Aloe Vera-based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. **Theriogenology**, 2016.

SWANSON, W.F. et al. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **ZoxxBiology**, v.22, p.421-441, 2003

TEBET, Jussara Maria. **Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*-Schreber, 1775), a jaguatirica (*eopardus pardalis*-Linnaeus, 1758) e o gato doméstico (*Felis catus*)**. Tese

(Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista. Campus de Botucatu, Botucatu, São Paulo, 2004.

VARGAS, Walter David Espinosa. **EFFECTO DE LA ADICION DE UN SURFACTANTE NATURAL (ALOE VERA) AL DILUYENTE TRILADYL® PARA CRIOCONSERVACION DE SEMEN BOVINO EN TOROS REPRODUCTORES DE AGSO-GENES, QUITO-PICHINCHA**. Tese para obtenção de título de médico veterinário – Universidad Técnica de Cotopaxi, Unidad Academica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Latacunga, 2012.

VICK, M. M. et al. Improved cryopreservation of domestic cat sperm in a chemically defined medium. **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 2120-2128, 2012.

VILLAYERDE, Ana Izabel Silva Balbin. **Comparação entre dois métodos de inseminação artificial utilizando sêmen congelado em gatos domésticos (*Felis catus*)**. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

VILLAYERDE, A. I. S. B. et al. Comparação entre dois métodos de coloração para análise morfológica e acrossomal de espermatozoides de gato doméstico (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 686-692, 2008.

VILLAYERDE, A. I. S. B. et al. 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, n. 4, p. 434-442, 2009.

WAURICH, R. et al. Embryonic gene activation in in vitro produced embryos of the domestic cat (*Felis catus*). **Reproduction**, v. 140, n. 4, p. 531-540, 2010.

ZAMBELLI, D. et al. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. **Theriogenology**, 2008; 69:485–90.

ZAMBELLI, D. et al. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. **Theriogenology**, v. 73, n. 7, p. 886-892, 2010.