



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

HENRIQUE ALBANO NOGUEIRA GOMES

**EFEITO DO EXTRATO ALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERDE NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE GATO
DOMÉSTICO (*Felis catus* – LINNAEUS, 1758)**

MOSSORÓ

2016

HENRIQUE ALBANO NOGUEIRA GOMES

**EFEITO DO EXTRATO ALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERDE NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE GATO
DOMÉSTICO (*Felis catus* – LINNAEUS, 1758)**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Marcelo Barbosa Bezerra, Prof. Dr.

MOSSORÓ

2016

ERRATA

©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.

G633e Gomes, Henrique Albano Nogueira.
EFEITO DO EXTRATO ALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERDE NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOÍDES EPIDIDIMÁRIOS
DE GATO DOMÉSTICO (*Felis catus* - LINNAEUS, 1758) /
Henrique Albano Nogueira Gomes. - 2016.
57 f. : il.

Orientador: Marcelo Barbosa Bezerra.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2016.

1. Felídeos. 2. Biotécnicas Reprodutivas. 3.
Espermograma. 4. CASA. 5. Própolis Verde. I.
Bezerra, Marcelo Barbosa, orient. II. Título.

HENRIQUE ALBANO NOGUEIRA GOMES

**EFEITO DO EXTRATO ALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERDE NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE GATO
DOMÉSTICO (*Felis catus* – LINNAEUS, 1758)**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 11 / 11 / 2016.

BANCA EXAMINADORA

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

Andréia Maria da Silva, Msc. (UFERSA)
Membro Examinador

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

A Henrique Ferreira Lima (*In Memoriam*),
meu bisavô de quem herdei o nome e
vontade de viver. Fonte de inspiração e de
garra ao trabalho contínuo.

A Venilton Gomes da Silva, meu pai,
meu suporte, meu amigo. Que tanto me
apoiou e ansiou pela chegada desse
momento.

A Ana Maria Nogueira da Silva, minha
mãe, conselheira e melhor amiga,
minha Dona Ana. Sem palavras... A
senhora é uma Rainha.

A Venilton Gomes da Silva Júnior, meu
irmão, amigo de todas as horas que
acreditou em mim mais do que
ninguém, e a quem devo muito de quem
eu sou.

AGRADECIMENTOS

A inteligência suprema, que nos rege e nos ilumina na jornada em busca do nosso Eu Maior. Bem como aos guias e amigos espirituais dessa eterna caminhada, pelos conselhos, mensagens, avisos e companhia constante.

Aos meus pais, Venilton Gomes da Silva e Ana Maria Nogueira da Silva, que sempre lutaram duro para me dar a melhor educação. Por todo esforço e confiança no meu potencial, pelo amor incondicional, carinho e preocupações. Pais melhores não poderiam existir.

Ao meu irmão, Venilton Gomes da Silva Júnior, pela amizade incondicional, pelas conversas, brincadeiras e todos os momentos juntos que só melhores irmãos/amigos sabem como funciona: apesar de não saber descrever esse sentimento, sabemos bem o que ele representa.

A Denilsa Pires Fernandes, minha namorada, companheira de trabalho no LTG-PIVE e na caminhada da vida, por todos os momentos felizes. Que seguiu de perto todo o meu desenvolvimento e as minhas dificuldades na vida acadêmica. Auxiliando-me sempre que precisei e me apoiando incondicionalmente nas minhas escolhas.

Ao meu querido orientador, Professor Dr. Marcelo Barbosa Bezerra. Por me acolher e confiar a mim o desenvolvimento de um projeto tão desafiador e importante. Por me motivar, instigando a sede pelo conhecimento e descobertas, dando a liberdade e a responsabilidade de experimentar o universo da biotecnologia animal junto a toda equipe do LTG-PIVE. Sendo uma fonte de inspiração na pesquisa e na educação.

A todos os meus familiares que torceram pela minha vitória. As minhas tias Rita Welma Nogueira Félix Barbosa, Expedita Nogueira Félix, Maria Vanilda da Silva Cavalcante, Vanderjânia Gomes da Silva. Ao meu tio Francisco Vantuil Gomes da Silva. As minhas avós Maria Albaniza Nogueira e Maria Ferreira da Silva. Ao meu avô Vital Gomes da Silva. E a todos meus outros tios e primos que torceram por mim.

Aos meus amigos da vida, da escola (colegas do CEC Ruy Barbosa e do Colégio Pólos), da

vizinhança, aos que porventura das circunstâncias perdi o contato e aos que permanecem ao meu lado até hoje. Ao meu amigo do peito Rodrigo Firmino Rodrigues, sem dúvidas está entre as pessoas mais importantes da minha vida, o meu muitíssimo obrigado, meu irmão. A De-Angelis de Souza e a Rafael Bandeira Correia Mendonça, com os quais eu tive a honra de dividir a moradia, também são parte dessa história. A Kaic Pereira Lima, amigo de infância, e hoje, um exemplo a ser seguido de pai e guerreiro. A Mikael Oliveira de Meneses, exemplo de prestatividade e definição de amizade leal. E a toda turma do Jubileu no CEC Ruy Barbosa.

Aos meus amigos do Ciência sem Fronteiras, e a Espanha, país que me acolheu e me abriu os olhos para uma nova cultura, um novo idioma, um novo estilo de vida, enfim, uma experiência inimaginável. Aos amigos brasileiros de todos os locais do nosso grandioso país, que ajudaram e partilharam dos momentos difíceis e dos momentos de alegria. Aos amigos estrangeiros, espanhóis, italianos, mexicanos, peruanos, americanos, ingleses, tchecos, franceses, etc. Com vocês, os estudos, as viagens, as festas, foram inesquecíveis. Em especial, meus agradecimentos a Paulo Henrique Gomes Santana, amigo de todas as horas. A Herbet Filipe dos Santos Sousa também conhecido como Lek TR, a parceria é forte. A Sheila Tiemi Nagamatsu, uma das pessoas que mais transformou minha vida positivamente, não tenho palavras para demonstrar meu carinho por você. A Tatiany Aparecida Teixeira Soratto, Mariana Camurça de Azevedo e Rubens Antônio da Silva, por fazerem parte dessa etapa da minha vida.

A turma da biotecnologia 2011.1. Sei, que ao longo do curso nos separamos, mas considero a melhor turma do curso que passou pela UFERSA, tanto no caráter, como no potencial, cada um com uma característica peculiar. Em especial agradeço a Sávio Barbosa Fernandes Cavalcante, com quem dividi o apartamento por 4 anos, um irmão que a vida proporcionou. A Kamilla Karen Araújo de Carvalho, por ser quem você é, sempre prestativa e talentosa, iluminando a todos ao seu redor. Luana Kelly Carvalho da Silva, por todos os bons momentos.

Aos meus amigos de Mossoró e a essa cidade, onde construí minha primeira morada longe dos meus pais. Foram 5 anos incríveis. Agradeço aos amigos da UFERSA, os quais cruzamos em uma ou outra disciplina, nas atividades da faculdade ou até mesmo por

intermédio de outras pessoas. A turma da biotecnologia 2012.2, a qual entrei no retorno do Ciências sem Fronteiras, onde fiz amizades incríveis com Pedro Henrique Fernandes de França, José Walter Mendes Farias Júnior, Rodrigo de Assis Mendes e Ysla Christine da Silva Fernandes. A Rackel Gurgel Hipólito e a Felipe Amâncio França da Cunha, por todo carinho e pelos momentos.

Aos companheiros de trabalho pelo aprendizado, pela dedicação e ajuda. Por todos os estresses e também pelos momentos alegres na rotina do LTG-PIVE, todos serviram de aprendizado mútuo. O tempo foi curto, mas sem dúvidas, todos tiveram sua parcela fundamental de importância, tanto para esse trabalho como na minha vida. Muito obrigado a Fernanda Araujo dos Santos, por ser uma segunda chefe e amiga, pelos ensinamentos e pela disciplina, pelas horas e horas dedicadas as atividades e também pela participação na banca de defesa deste trabalho. Brenna de Sousa Barbosa, por me salvar quando mais precisei e estava desesperado com o projeto, dando a famosa “luz no fim do túnel”. Roberta Gonçalves Izzo, a rainha do epidídimo, por toda a ajuda durante a rotina de experimentos. Luã Barbalho de Macêdo, Yago Dantas da Mata e Érika Almeida Praxedes, pela ajuda e disponibilidade durante os experimentos. A Parmênedes Dias de Brito, pelo auxílio com os “números” e parte do material da execução do projeto.

A equipe do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal da UFRSA coordenada pelo professor Dr. Alexandre Rodrigues Silva, pelo tempo dedicado e pelo auxílio na execução de parte desse projeto. Em especial a Andréia Maria da Silva pelo auxílio nas rotinas de experimentos e participação na banca de defesa, e ao próprio professor Dr. Alexandre Rodrigues Silva, por ceder materiais fundamentais para boa execução desse trabalho.

A todos os professores. Sem dúvidas, a profissão mais importante de todas, e em especial aos mestres que tiveram papel fundamental na minha educação e formação. No ensino médio posso citar os professores Vandeilton Sucupira Francelino e Mario Davi Martins de Lacerda, que me despertaram o amor pela biologia e posteriormente pela biotecnologia. E na academia agradeço especialmente aqueles que me orientaram, foram amigos e/ou fonte de inspiração e dedicação a educação e a formação dos seus alunos, muito obrigado Profa. Dra. Alessandra Fernandes Pereira, Prof. Msc. Marcelino Gevilbergue Viana, Prof. Dra.

Karolline Mikaelle de Paiva Soares, Prof. Dr. Marcos Antônio Nóbrega de Sousa, Profa. Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida e me ajudaram, mesmo que da menor forma possível, com uma palavra, um gesto ou uma atitude. As pequenas coisas, muitas vezes causam uma transformação gigantesca. Por isso, não poderia deixar de agradecer a vocês, desconhecidos ou conhecidos. Vocês fizeram diferença na minha vida e na minha formação.

“A ciência e a espiritualidade não estão em desacordo. É que a ciência é muito jovem para compreender e a religião muito conservadora para aceitar.”

(Adaptada do livro Anjos e Demônios, Dan Brown)

RESUMO

Atualmente existe uma intensa busca por substâncias de origem natural que promovam a manutenção da viabilidade dos espermatozoides após a criopreservação sem apresentar o revés da toxicidade celular. Nesse contexto, a própolis por apresentar várias propriedades benéficas relatadas se apresenta como uma substância potencial a ser explorada. Diante dessa perspectiva, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações da própolis verde na criopreservação de espermatozoides epididimários do gato doméstico (*Felis catus*). Para tanto, foram utilizados 17 complexos testículos-epidídimos de gatos. Inicialmente os epidídimos foram separados e a região caudal foi submetida a coleta por flutuação com diluente TRIS. Após a recuperação, as amostras foram analisadas em 4 grupos: amostras frescas, teste de toxicidade, amostras resfriadas e amostras descongeladas. Todas elas foram submetidas a um grupo controle e a três tratamentos diferentes de acordo com a concentração de própolis adicionada no diluente: P1 (0,1 mg/mL), P2 (0,3 mg/mL) e P3 (0,6 mg/mL). Os parâmetros avaliados foram: concentração, análise CASA, vigor, motilidade, integridade de membrana, funcionalidade de membrana, análise da condensação da cromatina e morfologia espermática. A própolis não apresentou toxicidade para as células espermáticas em nenhuma das concentrações avaliadas. Não houve influência do extrato da própolis nem do processo de criopreservação sobre a integridade e funcionalidade da membrana, condensação da cromatina espermática e classificação dos defeitos morfológicos. Os resultados da análise do CASA apresentaram uma redução da motilidade de todas as amostras resfriadas (com exceção do tratamento P3) e descongeladas. A morfologia espermática não sofreu alterações com relação à criopreservação, no entanto, apresentou um decaimento da porcentagem de células normais no tratamento P2 do grupo resfriado e nos tratamentos P1 e P2 do grupo descongelado. Os tratamentos com a própolis provavelmente inibiram o desenvolvimento dos micro-organismos observados nas amostras contaminadas. Com base nesses resultados, pode-se concluir que a concentração de 0,6 mg/mL (tratamento P3) da própolis verde apresentou os melhores resultados, promovendo a manutenção da motilidade dos espermatozoides após o resfriamento e a morfologia normal durante a curva de criopreservação. Além disso, a própolis possui uma potencial utilização como um componente do meio de criopreservação, visto que não é tóxica para os espermatozoides e possivelmente inibe micro-organismos contaminantes.

Palavras-chave: Felídeos. Biotécnicas Reprodutivas. Espermograma. CASA. Própolis Verde.

ABSTRACT

Currently there is an intense search for naturally occurring substances that promote viability maintenance of spermatozoa after cryopreservation without showing setback cell toxicity. In this context, the propolis due his many beneficial properties it's reported itself as a potential substance to be explored. Given this perspective it was aimed to evaluate the effect of different concentrations of propolis in epididymal spermatozoa cryopreservation of the domestic cat (*Felis catus*). Therefore, the separation of the complex testis-epididymis of 17 cats was performed. Initially the epididymis were separated and the caudal region was collected by flotation with TRIS diluent. After recovery, samples were analyzed in 4 groups: fresh samples, toxicity test, samples cooled and thawed. All of them were subjected to a control group and three different treatments according to the concentration of propolis added in Diluent: P1 (0.1 mg/mL), P2 (0.3 mg/mL) and P3 (0.6 mg/mL). The evaluated parameters were: concentration, CASA analysis, vigor, motility, membrane integrity, membrane functionality, analysis of chromatin condensation and sperm morphology. Propolis showed no toxicity to sperm cells in any of the tested concentrations. There was no influence of propolis extract neither the cryopreservation process on the integrity and functionality of the membrane, condensation of sperm cell chromatin and classification of morphological defects. The CASA analysis results showed a decrease in motility of all cooled samples (excepting the P3 treatment) and thawed. The spermatid morphology did not change in relation to cryopreservation, however, it was showed a reduction of the percentage of normal cells in the P2 treatment of cold group and P1 and P2 treatments of thawed group. The treatments with propolis probably inhibited the development of microorganisms observed in contaminated samples. Based on these results, it can be concluded that the concentration of 0.6 mg/mL (P3 treatment) of green propolis presented the best results, promoting the maintenance of sperm motility after cooling and normal morphology during the cryopreservation curve. In addition, propolis has a potential use as a component of the cryopreservation medium, since it is non-toxic to sperm and possibly inhibits contaminating microorganisms.

Keywords: Felidae. Reproductive Biotechniques. Spermogram. CASA. Green Propolis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Obtenção do extrato alcoólico diluído em TRIS. (A) Diluição da massa de própolis em agitador magnético. (B) Extrato alcoólico de própolis em diferentes concentrações.....	33
Figura 2	– Transporte e processamento dos complexos testículos-epidídimos. (A) CTE em solução salina. (B) Técnica de fatiamento da cauda do epidídimo.....	34
Figura 3	– Delineamento Experimental.....	36
Figura 4	– Análise morfológica de espermatozoides epididimários de gato. (A) Espermatozoides com morfologia normal. (B) Cauda enrolada. (C) Cauda quebrada. (D) Peça intermediária quebrada. (E) Cabeça dupla. (F) Peça intermediária dobrada.....	46
Figura 5	– Micro-organismos observados na análise morfológica de espermatozoides de gato. As setas apontam os grupamentos bacilares unidos na forma de estreptobacilos.....	47
Figura 6	– Micro-organismos bacilares visualizados através do software da análise CASA em amostra controle.....	48
Figura 7	– Valores do setup estabelecido para a avaliação do sêmen do gato doméstico no sistema HTR–IVOS-10, Botucatu, 2007.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	–	Principais componentes do extrato alcoólico da Própolis Verde.....	31
Quadro 2	–	Composição química do diluente (TRIS).....	34
Quadro 3	–	Variáveis do movimento espermático analisadas pelo método CASA..	36
Quadro 4	–	Escala de vigor espermático de acordo com a qualidade do movimento dos espermatozoides.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Teste de toxicidade do extrato alcoólico da própolis verde para os parâmetros da qualidade do movimento espermático.....	39
Tabela 2	–	Qualidade do movimento de subpopulações espermáticas por grupos (Amostra Fresca, Amostra Resfriada e Amostra Descongelada) e tratamentos (Controle, P1, P2 e P3) para as variáveis oriundas da análise no CASA.....	40
Tabela 3	–	Características das amostras por grupos (Amostra Fresca, Amostra Resfriada e Amostra Descongelada) e tratamentos (Controle, P1, P2 e P3) para as variáveis de vigor, funcionalidade de membrana, integridade de membrana e condensação da cromatina.....	43
Tabela 4	–	Morfologia e classificação dos defeitos espermáticos de gato por grupos (Amostra Fresca, Amostra Resfriada e Amostra Descongelada) e tratamentos (Controle, P1, P2 e P3).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Deslocamento Lateral da Cabeça
BCF	Frequência do Batimento Flagelar
CAPE	Éster fenetil do Ácido Caféico
CASA	Computer-Assisted Sperm Analysis
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CTE	Complexo Testículos-Epidídimos
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DC	Defeito Morfológico de Cauda
DP	Defeito Morfológico de Peça Intermediária
DK	Defeito Morfológico de Cabeça
DMSO	Dimetilsulfóxido
HOVET	Hospital Veterinário
IA	Inseminação Artificial
ICSI	Injeção Intracitoplasmática
LDL	Low Density Lipoprotein
LIN	Índice Linear (VSL/VCL)
LTG-PIVE	Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
MT	Motilidade Total
MP	Motilidade Progressiva
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
TES	Ácido Sulfônico N-tris-hidroximetil-metil-2-aminometano

TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
VCL	Velocidade Espermática ao Longo de uma Trajetória Real
VAP	Velocidade Espermática ao Longo de uma Trajetória Média
VSL	Velocidade Espermática ao Longo de uma Linha Reta

LISTA DE SÍMBOLOS

Mm	Micrômetro
mOsm	Mili Osmol
Kg	Quilograma
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Min	Minuto
mL	Mililitro
mg	Miligrama
N _L	Nitrogênio Líquido
<	Menor que

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1. CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN E DO ESPERMATOZOIDE FELINO	23
2.2. GATOS DOMÉSTICOS COMO MODELO PARA ANIMAIS SILVESTRES	23
2.3. RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS	24
2.4. TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA.....	25
2.5. CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES FELINOS	27
2.5.1. Diluentes na criopreservação.....	27
2.5.2. Crioprotetores na criopreservação	28
2.5.3. Aspectos técnicos da criopreservação	29
2.6. PRÓPOLIS VERDE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. SELEÇÃO DOS DOADORES DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS	32
3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO ALCOÓLICO DA PRÓPOLIS	32
3.3. COLHEITA DOS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS	33
3.4. CRIOPRESERVAÇÃO E TESTE DE TOXICIDADE	34
3.5. AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA.....	35
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1. OBTENÇÃO DO MEIO CONTENDO O EXTRATO DA PRÓPOLIS	39
4.2. TESTE DE TOXICIDADE	39
4.3. QUALIDADE DO MOVIMENTO DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS	40
4.4. VIGOR, INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA E CONDENSAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA	42
4.5. MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	45
4.6. EFEITO ANTIMICROBIANO	47
5. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO 1.....	57

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma tecnologia que tem como princípio a utilização de substâncias (crioprotetores) que permitem a manutenção de amostras biológicas a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água. Dessa maneira, essa técnica conserva as células em estado quiescente, preservando sua composição e viabilidade por tempo indeterminado (SILVA; GUERRA, 2011). A aplicação dessa tecnologia às células espermáticas de animais domésticos, de companhia ou de grande valor zootécnico, possibilita a preservação do material genético e possivelmente sua aplicação em outras técnicas da biotecnologia reprodutiva, como, por exemplo, a inseminação artificial (IA), produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (KUNKITTI et al., 2016; MARTINS; JUSTINO, 2015; MATTOS, 2001). Para 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 (DECO et al., 2010; SILVA et al., 2012). No caso dos felinos, essa justificativa é bastante evidente, visto que todas as espécies, com exceção do gato doméstico, estão ameaçadas ou em risco de extinção (IUCN, 2016).

A obtenção de espermatozoides felinos para criopreservação pode ocorrer por meio da eletroejaculação, vagina artificial ou ainda da obtenção de células espermáticas epididimárias. Essa última técnica apresenta algumas vantagens diante das demais, como por exemplo: possibilidade de recuperação de espermatozoides de animais *post mortem*, impossibilitados de ejacular ou copular, além disso, possuem elevada concentração celular após a colheita, e o animal não necessita ser treinado (EMERENCIANO et al., 2013; MARTINS; JUSTINO, 2015). Em relação a técnica de colheita que mais se adequa a esta biotécnica tem-se a flutuação, pois é a que melhor se adapta às pequenas dimensões do ducto epididimário do gato doméstico (ANGRIMANI et al., 2013; MOTA-FILHO; SILVA, 2012).

Apesar de sua importância, a criopreservação apresenta o revés do estresse celular devido às variações de temperatura, além da toxicidade celular, por conta das substâncias utilizadas no processo. Esse conjunto de fatores ocasiona efeitos prejudiciais à integridade e funcionalidade do espermatozoide. Sabe-se que células espermáticas de diferentes espécies possuem propriedades criobiológicas específicas e graus de sensibilidade variados para manipulação experimental, choque térmico, congelamento e tolerância osmótica (SILVA; GUERRA, 2011).

Nesse contexto, há uma crescente prospecção de substâncias de origem natural que

possam conferir proteção ao sêmen ou aos espermatozoides epididimários. Uma dessas substâncias é a própolis, que devido a suas propriedades biológicas, apresenta-se como uma matéria-prima com grande potencial na conservação da qualidade das células espermáticas submetidas à congelação. Sendo, portanto, intensamente investigada, por sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Além disso, diversos estudos procuram compreender os mecanismos de ação da própolis sobre a morfologia dos órgãos reprodutivos e sobre a produção de espermatozoides, bem como sua ação protetora sobre a estrutura da célula espermática (CAPUCHO et al., 2012; CEDIKOVA et al., 2014).

Diante dessa perspectiva, o objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato alcoólico da própolis adicionados ao meio diluente sobre células espermáticas obtidas da cauda do epidídimo do gato doméstico (*Felis catus*), submetidas ao resfriamento e a criopreservação.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN E DO ESPERMATOZOIDE FELINO

Sob condições fisiológicas normais, o sêmen felino possui o pH entre 6,6 - 8,8. Essa alcalinidade incrementa a mobilidade espermática e neutraliza a acidez da cavidade vaginal após a ejaculação (FLORINDO, 2011). Espermatozoides normais de gato medem aproximadamente 26 μm de comprimento e apresentam maior resistência a solução hipertônica, quando comparado a soluções hipotônicas. A osmolaridade do sêmen desta espécie varia entre 290 mOsm/kg a 320 mOsm/kg (FLORINDO, 2011; LUVONI, 2006).

As células espermáticas de felinos apresentam várias alterações morfológicas encontradas com frequência como a macro e microcefalia, cabeças duplas ou destacadas e caudas duplas, dobradas ou enroladas (FLORINDO, 2011). Outras alterações que são relatadas em felinos são a teratozoospermia, oligozoospermia e a astenozoospermia. A teratozoospermia é uma condição na qual os espermatozoides apresentam alta taxa de incidência de defeitos morfológicos, onde mais de 60% das células espermáticas são aberrantes (JEWGENOW et al. 2009; ZAMBELLI; LEVY, 2010). 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). Essa condição pode estar associada a uma diminuição da variação genética e a uma diminuição da secreção de testosterona (FILLIERS et al., 2010). A oligozoospermia se caracteriza pela baixa concentração de espermatozoides recuperados e a astenozoospermia pela motilidade das células ser menor que 70% (ZAMBELLI; LEVY, 2010).

O conhecimento e o estudo das características do sêmen e das células espermáticas de felinos são necessários para desenvolver metodologias que potencializem a conservação da sua qualidade. Esse fato é evidenciado quando se observa que o ejaculado dos felídeos tem características morfológicas e fisiológicas peculiares que dificultam a sua criopreservação (FILLIERS et al., 2010; FLORINDO, 2011; LUVONI, 2006).

2.2. GATOS DOMÉSTICOS COMO MODELO PARA ANIMAIS SILVESTRES

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 oferece uma ferramenta potencial para o resgate de material genético dos machos de populações ameaçadas. Adicionalmente, permite a aplicação desse material em diversas técnicas de reprodução assistida (COCCHIA et al., 2009).

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 o descongelamento, 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. Devido a isso, é necessário a padronização e desenvolvimento de um protocolo eficiente de criopreservação espermática para essa espécie, visto que os espermatozoides dos felídeos possuem características peculiares, produzindo resultados bastante variáveis. 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 a troca entre localidades distantes de germoplasma de felídeos de interesse ecológico e econômico (MACENTE et al., 2012).

Para realizar a técnica de criopreservação de espermatozoides é necessário inicialmente realizar a coleta, que pode ser feita por diversas metodologias.

2.3. RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS

A obtenção de espermatozoides em felinos pode ser realizada através de eletroejaculação, vagina artificial ou pelo processamento dos epidídimos de animais que passaram por esterilização cirúrgica ou que subitamente vieram a óbito (EMERENCIANO et al., 2013; KUNKITTI et al., 2016; ZAMBELLI et al., 2010). A técnica de recuperação de espermatozoides epididimários de gatos é de suma importância para avanços nas pesquisas de preservação de germoplasma, principalmente para felídeos selvagens (MACENTE et al., 2012). A perspectiva de armazenamento do complexo testículo-epidídimo sem grandes perdas

de viabilidade após a morte do animal ou castração é de até 5 horas a 36 °C ou 24 horas sob refrigeração a 5 °C, permitindo o resgate dos gametas para posterior processamento e criopreservação, aumentando a aplicabilidade dessa técnica em diferentes espécies de mamíferos (KUNKITTI et al., 2016; MOTA-FILHO; SILVA, 2012).

A colheita de espermatozoides epididimários pode ser realizada por diferentes abordagens a depender da espécie do animal. Em animais de pequeno porte, que geralmente possuem epidídimo de pequeno calibre, é preferível 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 fatiamento da estrutura epididimária e, em seguida, o repouso em um meio diluidor, para favorecer a migração dos espermatozoides para o meio diluidor. No fatiamento o epidídimo é seccionado em numerosos fragmentos e comprimido suavemente, com auxílio de pinças e/ou seringas, para promover o extravasamento do líquido epididimário. Outras técnicas menos utilizadas para animais de pequeno porte são o fluxo retrógrado e aspiração direta da cauda do epidídimo (ANGRIMANI et al., 2013; MOTA-FILHO; SILVA, 2012).

Utilizando a flutuação como técnica de recuperação espermática, o fatiamento do epidídimo gera inevitavelmente contaminação das amostras com células epiteliais, sanguíneas (devido a presença dos vasos), micro-organismos e outros debris, os quais podem levar a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) podendo afetar a capacidade fecundante dos espermatozoides (CHATDARONG; THUWANUT; MORRELL, 2010). Essa afirmação é outra justificativa para utilização da própolis como componente do meio diluidor, visto que essa substância possui atividade antioxidante relatada (CEDIKOVA et al., 2014; DE CASTILHO, 2008).

2.4 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

Posteriormente a colheita, avaliações microscópicas devem ser realizadas visando determinar a qualidade das células espermáticas, visto que essa qualidade está diretamente ligada à capacidade fecundante. As principais análises tem como princípio a avaliação dos componentes da célula espermática, como a membrana plasmática, o material genético e a morfologia celular, bem como a motilidade e qualidade desse movimento (MARTINS; JUSTINO, 2015). Os principais testes de avaliação espermática estão descritos a seguir:

A qualidade do movimento avalia de maneira geral a quantidade e a qualidade do movimento das células móveis. Pode ser avaliada de forma subjetiva, avaliando o vigor e a

motilidade total em microscópio óptico, ou de forma automática, através da análise seminal computadorizada (Computer-Assisted Sperm Analysis – CASA). O método de análise CASA, é um sistema completo (hardware e software) que avalia tanto características de células individuais, como populações de células, fornecendo valores como a motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade espermática ao longo de uma trajetória real (VCL), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade espermática ao longo de uma linha reta (VSL), índice de linearidade (LIN), deslocamento lateral da cabeça (ALH) e frequência do batimento flagelar (BCF) (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2010; MATOS et al., 2008).

- A morfologia espermática se baseia em alterações nas peças morfológicas dos espermatozoides: cabeça, peça intermediária e cauda. Um único espermatozoide pode ter mais de uma alteração, e para ser classificado como anormal, necessita apenas de uma. Para serem considerados normais, os espermatozoides não devem apresentar qualquer falha morfológica (SILVA et al., 2009);

- O teste hiposmótico ou teste de funcionalidade da membrana avalia a capacidade de trocas entre a membrana espermática e o meio através da exposição a diferentes gradientes de concentração de solutos. Dessa maneira, quando expostos a um meio hiposmótico, os espermatozoides com membrana funcional, irão assimilar mais água pela região com maior permeabilidade, a cauda. Esse processo ocasiona o “Swelling” ou enrolamento da cauda de espermatozoides normais, enquanto que aqueles com cauda reta são considerados não funcionais. Esse teste independe da motilidade inicial do espermatozoide, podendo este apresentar membranas funcionais inclusive em espermatozoides imóveis (SILVA et al. 2009);

- O teste de viabilidade ou integridade de membrana está fundamentado na coloração de células com ruptura na membrana plasmática. Assim, células com membranas íntegras não se coram quando submetidas à coloração vital (SILVA et al., 2009);

- A análise de condensação da cromatina através do corante azul de toluidina se baseia na compactação do material genético. Podendo ser identificada através da coloração do material genético ou fluorescência. No caso da coloração, os corantes interagem com o complexo compactado DNA-proteínas, corando as células com cromatina compactada (SILVA et al., 2009).

A análise espermática é de extrema importância para determinar a qualidade de amostras espermáticas durante e após o processo de criopreservação.

2.5. CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES FELINOS

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 (DA SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012).

A primeira tentativa de criopreservação de espermatozoides de gatos e, posterior utilização em inseminação artificial foi relatada por Platz; Wildt; Searge (1978). Desde então, a técnica foi aperfeiçoada e um grande número protocolos foi desenvolvido, inclusive o desenvolvimento da técnica de criopreservação de espermatozoides epididimários (LUVONI et al., 2003; TSUTSUI et al., 2003). A eficiência dos protocolos de conservação das células espermáticas depende da composição do diluente, da concentração adequada de crioprotetores e de uma taxa ideal de congelamento (HUSSAIN; LESSARD; ANZAR, 2011).

2.5.1. Diluentes na criopreservação

O diluente é o meio responsável pela manutenção da sobrevivência dos espermatozoides. Para tal, possuem várias funções, desde o fornecimento energético para manutenção do metabolismo, manutenção da pressão osmótica e concentração de eletrólitos, até a proteção da membrana espermática do choque térmico. Essa última função é essencial ao processo de criopreservação, visto que o grande revés dessa técnica são as injúrias à membrana celular (MARTINS; JUSTINO, 2015).

Os principais diluentes usados para felinos são o Tris (tris-hidroximetil-aminometano) e TES (ácido sulfônico N-tris-hidroximetil-metil-2-aminometano) adicionados de açúcares, que servem como substrato energético (DA SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012). Também pode ser utilizado como alternativa o diluente a base de água de coco em pó ou *in natura* e/ou extensores comerciais (JIMÉNEZ et al., 2013), no entanto, eles não apresentaram resultados positivos na coleta (SILVA, 2008) nem no resfriamento (LIMA et al., 2014) de espermatozoides felinos, apresentando diminuição da motilidade em ambos os casos, quando comparado ao Tris. Nos protocolos de criopreservação, esses diluidores geralmente são acrescidos de 10 a 20% de gema de ovo (crioprotetor extracelular), associados a um outro

crioprotetor intracelular. Algumas soluções diluidoras são adicionadas de antibióticos, como penicilina e estreptomicina e antioxidantes (DA SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012).

2.5.2. Crioprotetores na criopreservação

Os crioprotetores podem ser classificados como intracelulares e extracelulares, de acordo com a sua capacidade de transpassar a membrana celular, característica que está diretamente ligada ao tamanho molecular. De maneira geral, atuam modificando as propriedades do diluente, tornando o meio favorável à sobrevivência dos espermatozoides após as modificações físicas da congelação. As principais alterações são: prevenção da formação de cristais de gelo intracelular; redução do estresse osmótico; promover estabilidade da membrana e redução do ponto de congelação da água (SILVA; GUERRA, 2011). Várias substâncias crioprotetoras são aplicadas na criopreservação de células espermáticas, tais como os crioprotetores intracelulares glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol, e os extracelulares gema de ovo, leite em pó e açúcares simples (BITTENCOURT et al., 2013). Dentre essas substâncias as mais utilizadas para amostras de espermatozoides felinos são a gema de ovo (extracelular) e o glicerol (intracelular) (SILVA, 2008; COCCHIA et al., 2009; MACENTE et al., 2012; MACENTE, 2014).

A gema de ovo é utilizada em diversos protocolos de criopreservação para diferentes espécies. O mecanismo de ação da gema sobre a célula espermática não está totalmente elucidado, porém sabe-se que esta atua estabilizando as membranas, minimizando os efeitos negativos do choque térmico. Todavia, a gema apresenta algumas desvantagens, como a possibilidade de propagação da contaminação por 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).

O glicerol é o crioprotetor mais comumente utilizado na criopreservação de diversas espécies de mamíferos. Porém, sabe-se que esse crioprotetor, em determinadas concentrações e temperaturas, apresenta efeito tóxico sobre as células. A toxicidade do glicerol varia significativamente entre as espécies (DECO-SOUZA et al., 2013). Nos felídeos, concentrações iguais ou superiores a 8% de glicerol são consideradas tóxicas aos espermatozoides (DA SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012). O glicerol ou propano-1,2,3-triol atua diretamente na membrana plasmática, ligando-se aos fosfolípidos 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 de amostras espermáticas a 4 – 5 °C, com a finalidade de reduzir os seus efeitos tóxicos (SILVA; GUERRA, 2011).

2.5.3. Aspectos técnicos da criopreservação

Durante o processo de criopreservação é importante controlar a taxa de refrigeração da amostra de sêmen e/ou lavado epididimário. Sabe-se que o resfriamento modifica a fluidez da membrana e promove a formação de pequenos cristais de gelo, que podem agrupar-se e gerar o rompimento da membrana da célula (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. (2009) 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 nas espécies gato e tigre. Já Bonaure et al. (2013) submeteram as amostras biológicas a 20 minutos de resfriamento e observaram alterações na membrana plasmáticas, no acrossoma e nas mitocôndrias dos espermatozoides congelados-descongelados. Acredita-se então que taxas mais lentas de refrigeração (0,2 a 0,5 °C/ min) minimizam os danos causados às membranas plasmáticas e acrossomais dos espermatozoides (PUKAZHENTHI et al., 1999).

Além da curva de criopreservação, outro parâmetro bastante discutido é a centrifugação, onde é recomendada a centrifugação das amostras a baixa rotação. Em trabalhos já publicados, observou-se força de rotação que variou de 300-800 g por 5 a 20 minutos (CHATDARONG; THUWANUT; MORRELL, 2010; COCCHIA et al., 2009; MACENTE et al., 2012; WAURICH et al., 2010). Apesar da variação, a centrifugação dos espermatozoides é uma etapa essencial. No caso de amostras oriundas da ejaculação essa etapa é importante para retirada do plasma seminal (DA SILVA; ACKERMANN; SILVA, 2012). Enquanto que nas amostras obtidas do epidídimo, é importante para promover a lise das células sanguíneas oriundas dos vasos adjacentes a estrutura epididimária que porventura venham a contaminar a amostra (KUNKITTI et al., 2016).

Assim como as demais etapas citadas acima, a descongelação dos espermatozoides é extremamente relevante na garantia da manutenção da motilidade e, conseqüentemente da capacidade de fecundação dessas células, devendo ser rigorosamente controlada (DA SILVA;

MOTA-FILHO, 2012). A descongelação é realizada por imersão das palhetas de 0,25 mL 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. Além disso, a busca por novas substâncias, vem aprimorando a técnica de criopreservação de espermatozoides. Uma dessas substâncias é a própolis, que por apresentar propriedades biológicas de interesse, como a atividade antimicrobiana e antioxidante, torna-se um potencial componente de meios de criopreservação.

2.6. PRÓPOLIS VERDE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES

A própolis é uma substância resinosa de composição complexa, coletada por abelhas a partir de diversas plantas e/ou de diferentes partes da mesma planta, sendo modificada na colmeia através da adição de secreções salivares e cera (DOS SANTOS, 2014). A composição da própolis depende da origem botânica e da espécie de abelha. Mas de modo geral, essa substância natural é constituída de 55% de resinas vegetais, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e 5% de pólen (CAPUCHO et al., 2012).

A própolis verde é encontrada apenas no Brasil, principalmente região de São Paulo e Minas Gerais, e está associada à planta de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Este composto apresenta uma gama de propriedades biológica, tais como antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitária, anti-inflamatória, quimiopreventiva, imunomoduladora, hepatoprotetora e antioxidante (CEDIKOVA et al., 2014).

A própolis possui mais de 160 componentes químicos, incluindo flavonoides, ácidos aromáticos, terpenos, aldeídos, álcoois, ésteres, aminoácidos, esteroides, açúcares, vitaminas e minerais. A atividade antioxidante da própolis está associada à presença de substâncias como flavonoides, vitaminas A e C, CAPE (Éster fenetil do ácido caféico), ácido dicafeioquínico e propol (DE CASTILHO, 2008). De Sousa et al. (2009) detectaram diversos compostos fenólicos associados a atividade antioxidante, tais como ácidos caféicos, ácido ferúlico, ácido p-cumário, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico e baccarin. A síntese desses componentes pela planta está intimamente relacionada a condições de estresse ambiental.

O tipo de extração utilizando o álcool como solvente é importante, pois consegue retirar da amostra natural o máximo de componentes possíveis. Apesar da composição da própolis ser influenciada por vários fatores, acredita-se que os principais componentes da própolis verde são similares aos caracterizados por Dos Santos (2014), descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Principais componentes do extrato alcoólico da Própolis Verde.

Componentes	Concentração (mg/g)
Ácido P-Cumárico	4,673
Ácido-3-Prenil-4-Hidroxicinâmico	1,951
Canferida	5,623
Ácido-3,5-Diprenil-4-Hidroxicinâmico	16,322
Ácido Cinâmico e Derivados	6,692

Fonte: Dos Santos, 2014.

Na literatura já foi relatado à ação antioxidante da própolis sobre a fertilidade em animais de laboratório (ELMAZOU DY; ATTIA; EL-SHENAWY, 2011; GARCIA et al., 2012). Recentemente, Dos Santos (2014) investigou o uso da própolis no resfriamento de sêmen equino, observando redução da motilidade durante o processo e relatou que possivelmente as concentrações utilizadas foram elevadas, culminando em um efeito tóxico às células espermáticas. No estudo de Ögretmen; Inanan; Öztürk (2014), a própolis mostrou-se como ótimo componente do meio crioprotetor para o sêmen de peixe, incrementando de forma significativa a motilidade dos espermatozoides após a descongelação.

Além da função antioxidante, a atividade antimicrobiana da própolis é relatada desde a antiguidade e amplamente descrita pela medicina tradicional (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). Essa atividade está relacionada principalmente aos flavonoides, ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas (ENDLER et al., 2003; FERNANDES JÚNIOR et al., 2006), e desencadeia ação contra diversas cepas de bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e leveduras (FERNANDES JÚNIOR et al., 2006; LUSTOSA, 2007; VARGAS et al., 2004). Apesar da ação bactericida e bacteriostática comprovadas, ainda não se sabe os mecanismos pelos quais os constituintes da própolis promovem a atividade antimicrobiana (ENDLER et al., 2003).

Sendo assim, devido, principalmente, as suas atividades antimicrobiana e antioxidante, e na tentativa de encontrar alternativas aos produtos de origem animal utilizados como crioprotetores, a própolis pode ser uma alternativa de antioxidante natural que contribua para melhorar a qualidade dos espermatozoides criopreservados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DOS DOADORES DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS

O critério inicial para seleção das amostras foi a idade dos doadores. Na qual foi estabelecida como idade mínima 12 meses, visto que a puberdade dos gatos está situada entre 8 e 10 meses. Sendo esse o período a partir do qual essa espécie produz células espermáticas normais e em boa concentração (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001).

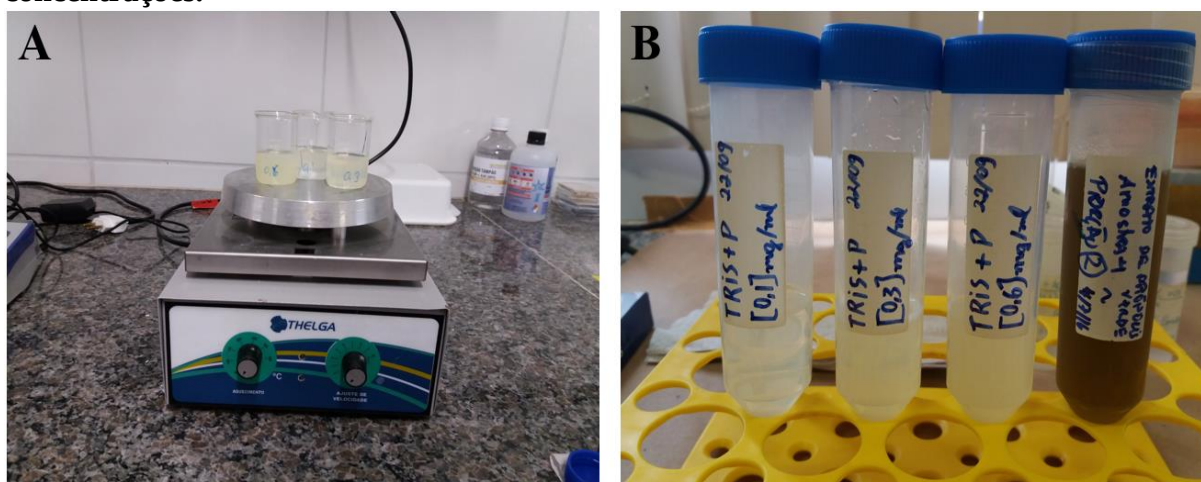
O segundo critério foi a qualidade do movimento das células espermáticas na amostra fresca recém-coletada, assim, dos dezessetes CTE's colhidos e processados apenas onze geraram amostras satisfatórias para seguir com o protocolo de resfriamento e criopreservação. Essa seleção foi baseada na motilidade e vigor espermático, dessa maneira, amostras com motilidade < 50% e vigor < 3 foram descartadas.

3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO ALCOÓLICO DA PRÓPOLIS

A coleta da própolis verde foi realizada na cidade de Nazareno- Minas Gerais, sendo a sua origem botânica predominante a *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha do campo. Preparou-se então o extrato alcoólico baseado na metodologia adaptada de Park et al. (1998). Para tanto, iniciou-se o tritramento da própolis, seguido da extração em álcool cereal. Todo o processo foi realizado com o auxílio de banho-maria em água termostatzada, sob agitação manual e aquecimento constante a 60 °C por 2 horas.

O extrato alcoólico pronto foi conservado a 5 °C em tubos de fundo cônico tipo Falcon de 50 mL até a sua utilização. Para adição do extrato no meio de criopreservação, este foi mantido em banho-maria a 60 °C até a completa evaporação do solvente. O extrato seco resultante foi solubilizado no próprio diluente da criopreservação (TRIS), com o auxílio de um agitador magnético a temperatura de 60 °C (Figura 1A). Uma vez obtido o extrato solubilizado no meio diluente, foram preparadas três diluições baseadas na relação massa da própolis/volume de TRIS até atingir as concentrações de 0,1 mg/mL (P1); 0,3 mg/mL (P2); 0,6 mg/mL (P3) (Figura 1B).

Figura 1 - Obtenção do extrato alcoólico diluído em TRIS. (A) Diluição da massa de própolis em agitador magnético. (B) Extrato alcoólico de própolis em diferentes concentrações.



Fonte: Acervo do autor.

3.3. COLHEITA DOS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

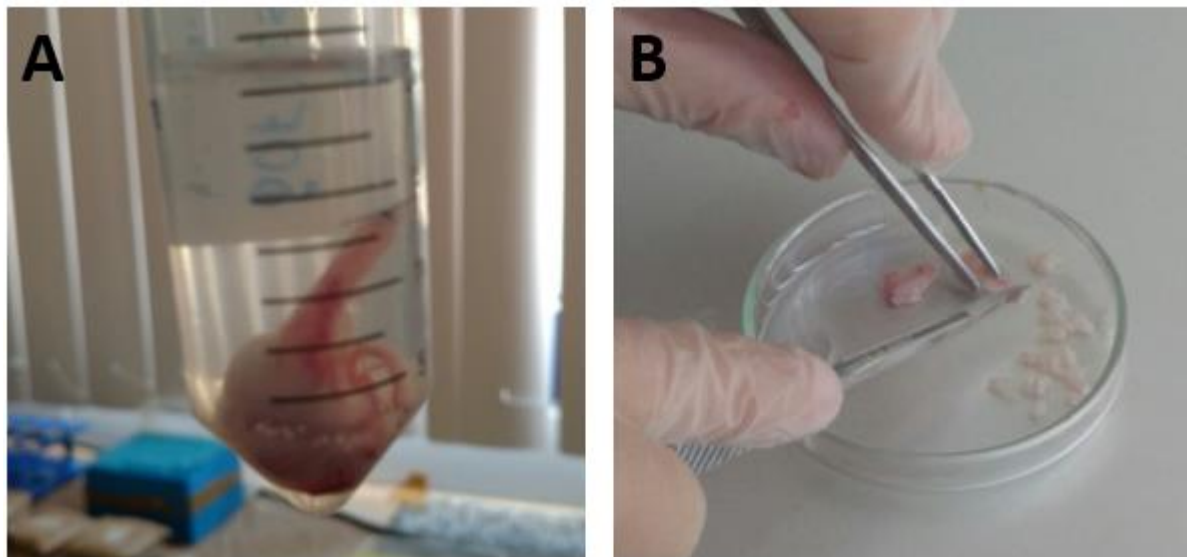
Os espermatozoides epididimários desse estudo foram obtidos *ex situ* a partir do aproveitamento de complexos testículos-epidídimos (CTEs) provenientes de castrações eletivas realizadas rotineiramente no Hospital Veterinário (HOVET) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), estando dessa maneira, em total conformidade com normas éticas preconizadas pela Lei 11794/2008 e amparada pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA (Capítulo VI; item 6.1.10, sub-item B-II) (BRASIL, 2008).

Foram colhidos CTEs de dezessete gatos adultos e saudáveis com idade entre 12 e 34 meses. Após a colheita, os CTEs foram transportados à temperatura ambiente até o Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In Vitro* de Embriões (LTG-PIVE) em tubos plásticos de fundo cônico de 50 mL contendo solução salina acrescida de penicilina (Figura 2A). A abordagem do CTE ocorreu em placa de Petri de 35 mm de diâmetro, onde foi selecionada apenas a cauda do epidídimo, visto que essa região possui a maior concentração de espermatozoides em completo estágio de desenvolvimento.

A estrutura anatômica selecionada foi transferida para outra placa de Petri contendo 1 mL de solução Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (Quadro 2), onde procedeu-se a colheita dos espermatozoides pela técnica da flutuação, que consistiu de três etapas: separação da cauda do epidídimo do CTE; remoção de vasos sanguíneos e incisões para proporcionar a migração dos espermatozoides no lúmen da cauda do epidídimo; repouso para migração dos

espermatozoides para o meio (Figura 2B) (JIMÉNEZ et al., 2011; MOTA-FILHO, 2014).

Figura 2 - Transporte e processamento dos complexos testículos-epidídimos. (A) CTE em solução salina. (B) Técnica de fatiamento da cauda do epidídimo.



Fonte: Acervo do autor.

Quadro 2 - Composição química do diluente (TRIS).

Componentes	g/L
D-frutose	12,5
Ácido cítrico mono-hidratado	17,8
TRIS	30,28
Água destilada	1000 mL

Fonte: Salamon; Visser, 1972.

3.4. CRIOPRESERVAÇÃO E TESTE DE TOXICIDADE

As amostras biológicas foram submetidas a quatro tratamentos (Controle, P1, P2, P3), todos com a mesma curva de congelação. No Controle, as amostras foram submetidas ao protocolo convencional de criopreservação, já estabelecido na literatura por Cocchia et al. (2009). Esse protocolo utiliza os crioprotetores glicerol e gema de ovo em concentrações de 4% e 20%, respectivamente, diluídos em solução TRIS. Enquanto que, nos tratamentos P1, P2, P3 foram adicionados às amostras a mesma proporção dos componentes do grupo controle acrescidos do extrato alcoólico da própolis nas concentrações de 0,1 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,6 mg/mL, respectivamente.

Os espermatozoides obtidos do fatiamento da cauda do epidídimo foram submetidos a uma centrifugação (500 g por 6 min) antes de serem diluídos nas soluções. Após a diluição,

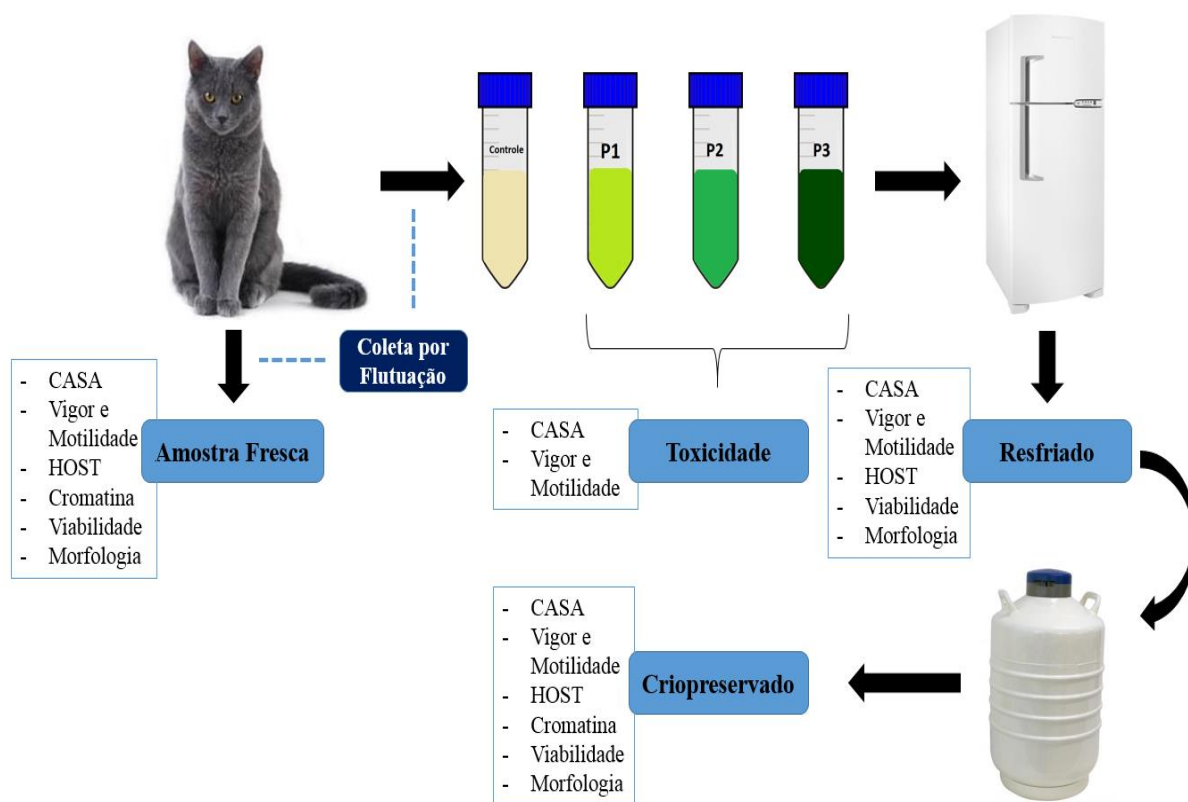
no respectivo tratamento, as amostras foram avaliadas para os parâmetros da qualidade do movimento espermático (Análise CASA) e vigor, com a finalidade de determinar se as concentrações da própolis utilizadas no tratamento seriam tóxicas ou não para as células espermáticas (Teste de Toxicidade). Constatada a não toxicidade, seguiu-se com acondicionamento sob refrigeração a 4 °C por 60 minutos. Passados 55 minutos de acondicionamento, foi adicionada a solução crioprotetora contendo o glicerol na concentração de 4%, bem como retirou-se as amostras para avaliação das células espermáticas refrigeradas. Sendo analisados todos os parâmetros citados no tópico 3.5, com exceção da análise de condensação da cromatina.

Logo em seguida, as amostras foram envazadas em palhetas francesas de 0,25 mL com concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL, 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 (N_L). Ao fim deste período, as palhetas foram acondicionadas em botijão de nitrogênio a -196 °C.

As palhetas foram descongeladas após o intervalo de uma semana, sendo retiradas da canuleta do botijão de N_L , mantidas a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) por 5 segundos e posteriormente imersas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. Em seguida, foram transferidas para tubos plásticos de 2 mL aclimatados a temperatura ambiente e, imediatamente após, submetidas a avaliação espermática descrita no tópico 3.5.

3.5. AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

Após a colheita, realizou-se avaliações dos parâmetros espermáticos de velocidade e qualidade do movimento, vigor, concentração, viabilidade, análise de condensação da cromatina, funcionalidade da membrana e morfologia. Em suma, foram realizadas avaliações espermáticas em 4 momentos: espermatozoides frescos após a coleta (todas as análises), após a adição do tratamento (teste de toxicidade – Análise Casa e vigor), amostra resfriada (todas as análises com exceção da análise de condensação da cromatina) e após a descongelação (todas as análises), como observado na Figura 3.

Figura 3 – Delineamento Experimental

Para analisar a qualidade do movimento, as amostras foram submetidas à avaliação computadorizada. Para isso 2 µl da amostra foram inseridos em uma Câmara de Makler (Sel-Medical Instruments), previamente aquecida a 37 °C e avaliada no sistema com valores previamente ajustados para felinos (ANEXO 1) (VILLAYERDE, 2007). As variáveis analisadas estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3 - Variáveis do movimento espermático analisadas pelo método CASA.

Variável (unidade de medida)	Descrição
MT (%)	Motilidade Total
MP (%)	Motilidade Progressiva
VCL (µm/s)	Velocidade Espermática ao Longo de uma Trajetória Real
VAP (µm/s)	Velocidade Espermática ao Longo de uma Trajetória Média
VSL (µm/s)	Velocidade Espermática ao Longo de uma Linha Reta
LIN (%)	Linearidade (VSL/VCL)
ALH (µm)	Deslocamento Lateral da Cabeça
BCF (Hz)	Frequência do Batimento Flagelar

Fonte: adaptada de Matos et al. (2008).

Na análise subjetiva, foram avaliados o vigor espermático e a motilidade, para tal foi adicionada uma gota de 5 µl da amostra sobre uma lâmina pré-aquecida a 37 °C, esta foi analisada em microscópio com 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, de acordo com a qualidade do movimento (Quadro 4).

Quadro 4 - Escala de vigor espermático de acordo com a qualidade do movimento dos espermatozoides.

Qualidade do Movimento	Descrição
0	Células paradas, sem nenhum movimento;
1	Células se movimentam, no entanto, não se deslocam;
2	Células se deslocam em círculos, movimento circular;
3	Células se deslocam de forma progressiva, lentamente;
4	Células se deslocam de forma progressiva, rapidamente;
5	Células se deslocam progressivamente em velocidade flechante.

Fonte: adaptada de Johnston; Kustritz; Olson, 2001.

A concentração total espermática foi calculada a partir da diluição de 5 µl da amostra biológica com 95 µl de solução salina formolizada a 0,1%. Sendo feita a contagem em uma câmara hematómica com auxílio de um microscópio (EMERENCIANO et al., 2013).

Para determinar a viabilidade celular foram utilizadas alíquotas de 5 µl adicionadas de 5 µl do corante azul de bromofenol em lâminas de vidro. Sendo posteriormente realizado o esfregaço e contagem de cem células por lâmina, sob microscopia de luz (400x) e consideradas viáveis ou não de acordo com a coloração ou transparência apresentada (EMERENCIANO et al., 2013).

Para o teste de análise da condensação da cromatina, foi adicionado em uma lâmina 10 µl da amostra, seguido do esfregaço da mesma. Seguiu-se com o procedimento de fixação: 1 minuto em solução de etanol e ácido acético na proporção de 3:1; 3 minutos em solução de etanol 70%; 25 minutos em solução de HCl (ácido clorídrico) 4M. Após a fixação, a lâmina foi lavada com água destilada. Após secar, foi adicionado 5 µl do corante azul de toluidina (pH 4) e contados 500 espermatozoides em aumento de 400x. Avaliou-se o estado de condensação do material genético a partir da presença ou ausência da coloração azul (KAMIMURA; JACOMINI; BELETTI, 2010).

O teste de funcionalidade de membrana ou teste hiposmótico consistiu na incubação de 5 µl da amostra por 60 minutos em 45 µl de solução com osmolaridade de 150 mOsm/L. Sendo posteriormente preparadas as lâminas de leitura, nas quais foram contadas 100 células espermáticas, avaliando se a cauda permanecia reta ou enrolada (EMERENCIANO et al., 2013).

A avaliação da morfologia espermática consistiu na preparação de lâminas contendo 5 µl da amostra diluída em 45 µl de solução corante rosa bengala a 1,5%. Foram contados, de forma aleatória, 200 espermatozoides em um microscópio com aumento de 400 vezes, analisando a quantidade de células normais e anormais. E dentre as células anormais, foram avaliadas alterações 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 por célula espermática, mais de uma anormalidade. Cada uma dessas anormalidades foi classificada como defeitos de cabeça, de peça intermediária e de cauda (RASKIN; MEYER, 2011).

3.6. 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 Statística 8.0 (Statsoft INC, 2007). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov–Smirnov. Posteriormente, os valores obtidos a partir das análises do CASA, HOST, viabilidade, morfologia e condensação da cromatina 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 $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DO MEIO CONTENDO O EXTRATO DA PRÓPOLIS

Para a obtenção final do meio diluente contendo a própolis, após a evaporação do solvente, foi utilizado o próprio TRIS (do meio de criopreservação) como diluente, visto que, a partir de um teste de solubilidade, este diluiu de forma mais homogênea e rápida o extrato seco, quando comparado a outros solventes testados como tampão fosfato e água para embriões (DADOS NÃO PUBLICADOS). Além disso, adicionou-se menor número de substâncias possíveis ao meio de criopreservação, evitando a utilização de outro diluente poderia afetar de maneira desconhecida a qualidade das células espermáticas.

4.2. TESTE DE TOXICIDADE

Os resultados para o teste de toxicidade oriundos da análise CASA (MT, VAP, VCL, VSL, LIN, ALH, BCF) para a qualidade do movimento espermático e da análise subjetiva do vigor, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Teste de toxicidade do extrato alcoólico da própolis verde para os parâmetros da qualidade do movimento espermático.

Variável	FRESCO	Teste de Toxicidade		
		P1	P2	P3
Vigor	3,17 ± 0,41	2,67 ± 1,03	3,00 ± 0,00	3,00 ± 1,09
MT (%)	78,33 ± 9,37	53,33 ± 20,88	58,67 ± 16,5	60,50 ± 16,91
VAP (µm/s)	64,27 ± 4,10	60,98 ± 8,13	60,05 ± 3,89	70,17 ± 11,64
VCL (µm/s)	128,68 ± 4,86	110,55 ± 17,26	113,90 ± 10,69	120,22 ± 7,44
VSL (µm/s)	45,48 ± 3,51	46,35 ± 7,99	44,42 ± 6,47	56,37 ± 11,72
LIN (%)	37,50 ± 3,56	43,50 ± 4,13	43,17 ± 7,63	46,83 ± 7,63
ALH (µm)	6,90 ± 1,36	7,43 ± 2,14	8,60 ± 1,27	8,80 ± 2,00
BCF (Hz)	20,15 ± 2,51	18,80 ± 2,00	20,52 ± 3,82	19,43 ± 2,00

P1: concentração de própolis a 0,1 mg/mL; P2: concentração de própolis a 0,3 mg/mL; P3: concentração de própolis a 0,6 mg/mL; Controle: Sem adição de própolis; MT: Motilidade Total; VAP: Velocidade ao longo de uma trajetória média; VCL: Velocidade ao longo de uma trajetória real; VSL: Velocidade ao longo de uma linha reta; LIN: Linearidade; ALH: Deslocamento Lateral da Cabeça; BCF: frequência do batimento flagelar. Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn ($p < 0,05$).

Em nenhum dos parâmetros avaliados, ocorreu diferença ($p < 0,05$) da amostra fresca

(sem adição do extrato da própolis) com relação aos tratamentos P1 (0,1 mg/ml), P2 (0,3 mg/ml), e P3 (0,6 mg/ml). A partir desses resultados, pode-se inferir que nenhuma das concentrações utilizadas, ocasionaram toxicidade aos espermatozoides epididimários, visto que não houve decréscimo na qualidade do movimento.

4.3. QUALIDADE DO MOVIMENTO DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS

Os dados obtidos para os parâmetros da motilidade espermática, parâmetros de velocidade (VAP, VCL e VSL), LIN, ALH e BCF, oriundos da análise CASA, estão expressos na Tabela 2. Pode-se observar que a motilidade total da análise do CASA não apresentou diferença ($p > 0,05$) dentro dos tratamentos de um mesmo grupo (Amostra Resfriado e Amostra Descongelada). Tampouco, o controle e o tratamento P3 do grupo “Resfriado”. Em divergência, os tratamentos P1 e P2 do grupo “Resfriado” apresentaram um decaimento significativo com relação à amostra fresca. O decaimento persistiu no controle e em todos os tratamentos da amostra descongelada, com relação à amostra fresca e em comparação com o grupo resfriado.

Tabela 2 - Qualidade do movimento de subpopulações espermáticas por grupos (Amostra Fresca, Amostra Resfriada e Amostra Descongelada) e tratamentos (Controle, P1, P2 e P3) para as variáveis oriundas da análise no CASA.

Tratamento	MT (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
FRESCO	78,33 $\pm$ 9,37	64,27 $\pm$ 4,10	128,68 $\pm$ 4,86	45,48 $\pm$ 3,51	37,50 $\pm$ 3,56	6,90 $\pm$ 1,36	20,15 $\pm$ 2,51
Resfriado	Controle	61,83 $\pm$ 22,70	76,45 $\pm$ 11,15	136,05 $\pm$ 26,75	58,78 $\pm$ 10,52	45,17 $\pm$ 6,94	8,55 $\pm$ 0,79
	P1	54,83 $\pm$ 13,92 ^a	66,22 $\pm$ 5,05	119,67 $\pm$ 9,93	49,78 $\pm$ 4,73	44,33 $\pm$ 6,05	8,10 $\pm$ 1,65
	P2	58,67 $\pm$ 8,21 ^a	63,68 $\pm$ 9,39	114,03 $\pm$ 9,23	49,83 $\pm$ 9,06	46,33 $\pm$ 6,53	7,37 $\pm$ 1,53
	P3	74,17 $\pm$ 18,45	64,00 $\pm$ 6,36	116,48 $\pm$ 13,91	47,15 $\pm$ 6,05	42,67 $\pm$ 7,94	8,03 $\pm$ 1,03
							19,30 $\pm$ 4,14
Descongelado	Controle	15,50 $\pm$ 8,55 ^b	53,57 $\pm$ 10,88	89,33 $\pm$ 31,10	43,57 $\pm$ 8,52	60,00 $\pm$ 13,16	6,83 $\pm$ 6,16
	P1	15,50 $\pm$ 15,58 ^b	64,23 $\pm$ 13,75	95,18 $\pm$ 38,20	53,33 $\pm$ 15,34	62,17 $\pm$ 21,89	6,00 $\pm$ 4,22
	P2	15,67 $\pm$ 5,2 ^b	62,55 $\pm$ 37,70	90,57 $\pm$ 58,55	55,73 $\pm$ 35,76	56,50 $\pm$ 30,28	6,22 $\pm$ 4,98
	P3	12,67 $\pm$ 6,77 ^b	67,32 $\pm$ 29,43	103,68 $\pm$ 45,24	49,92 $\pm$ 27,55	48,83 $\pm$ 23,31	6,55 $\pm$ 5,44
							13,83 $\pm$ 11,86

P1: concentração de própolis a 0,1 mg/mL; P2: concentração de própolis a 0,3 mg/mL; P3: concentração de própolis a 0,6 mg/mL; Controle: Sem adição de própolis; MT: Motilidade Total; VAP: Velocidade ao longo de uma trajetória média; VCL: Velocidade ao longo de uma trajetória real; VSL: Velocidade ao longo de uma linha reta; LIN: Linearidade; ALH: Deslocamento Lateral da Cabeça; BCF: frequência do batimento flagelar. 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, P1, P2, e P3). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn ($p < 0,05$).

Os parâmetros de velocidade (VAP, VCL e VSL), LIN, ALH e BCF, não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os grupos e nem entre os tratamentos de um mesmo grupo. Os valores de VAP variaram entre 53,57 $\mu\text{m/s}$ e 76,45 $\mu\text{m/s}$, VCL entre 89,33 $\mu\text{m/s}$ e 136,05 $\mu\text{m/s}$ e VSL entre 43,57 $\mu\text{m/s}$ e 58,78 $\mu\text{m/s}$. Os valores de LIN variaram entre 37,50% e 62,17%, ALH entre 6,00 μm e 8,80 μm e BCF entre 10,23 Hz e 23,78 Hz (Tabela 2).

Em estudo utilizando espermatozoides epididimários foi obtida taxa de motilidade total (CASA) de 67,32% para a amostra fresca (LIMA, 2015), valor inferior ao recuperado nesse estudo, de 78,33%. Já quando avaliou-se espermatozoides contidos no sêmen fresco, também a partir do CASA, foram obtidas taxas de 88,1% (MAGALHÃES, 2013) e 89% (VILLAYERDE, 2007). Diversos autores relataram valores na literatura de motilidade total de amostras frescas, variando de 54,7% até 75%, demonstrando que o valor de 72,5% obtido nesse estudo está dentro da normalidade (COCCHIA et al., 2009; EMERENCIANO et al., 2013; FLORINDO, 2011; MACENTE et al., 2012; MACENTE, 2014). Para gatos domésticos, são relatados resultados de motilidade pós-descongelção de: 23,7% (MACENTE, 2012) e 24% (TSUTSUI et al., 2003) para lavado epididimário; 52,8% (VILLAYERDE, 2007) e 70,6% (PLATZ et al., 1978) para sêmen coletado por vagina artificial; e 70% por eletroejaculação (CHATDARONG et al., 2007).

Com relação as variáveis VAP, VCL, VSL, LIN, ALH e BCF, todas elas foram semelhantes aos valores descritos na literatura para amostras recuperadas da cauda do epidídimo de gatos, respectivamente, 47,15 $\mu\text{m/s}$, 86,55 $\mu\text{m/s}$, 33,75 $\mu\text{m/s}$, 39,65%, 3,94 μm e 5,96 Hz (LIMA, 2015). Porém, divergem dos dados encontrados em amostras seminais, respectivamente, 140,2 $\mu\text{m/s}$, 171,7 $\mu\text{m/s}$, 123,2 $\mu\text{m/s}$, 71,8 %, 4,3 μm , 36,2 Hz (VILLAYERDE, 2007).

A partir das análises anteriores é possível observar que a qualidade do movimento espermático tem uma relação íntima com a fonte de recuperação dos espermatozoides. Essa diferença é notável quando se compara o sêmen com os espermatozoides epididimários. Fatores como o contato das células espermáticas com os líquidos seminais provavelmente possuem influência nesses parâmetros. Sabe-se, por exemplo, que o conteúdo do plasma seminal está diretamente ligado com a fertilidade dos machos (ARAÚJO, 2014) e exerce várias funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação como a ativação da motilidade espermática (GUASTI; MONTEIRO; PAPA, 2012), o que pode explicar o fato de amostras seminais possuírem motilidade superior aquelas recuperadas do epidídimo.

Outra teoria que está ligada a esse resultado diz respeito às ROS (espécies reativas de oxigênio). Apesar dessas substâncias em altas quantidades causarem danos a nível molecular

(material genético, lipídios e proteínas) e funcional (estresse oxidativo e diminuição do metabolismo) a presença destes compostos em baixas quantidades, está ligada ao processo de capacitação espermática como a hiperativação da motilidade. O sêmen é o responsável pela produção do ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, relacionados a esse processo (MAIA; BICUDO, 2009). No entanto, ainda são necessários estudos que realizem essa comparação de forma específica e padronizada, com o intuito de entender melhor as características e os fatores que influenciam nessa diferença.

Todos os parâmetros que relacionam a qualidade do movimento espermático estão intimamente ligados com a fertilidade do animal e consequentemente com a utilização dessas células para as técnicas que visem a fecundação *in vitro* ou *in vivo*. Apesar da motilidade ser considerada comumente como o parâmetro mais importante para predizer a capacidade de fecundação de um ou uma população de espermatozoides (COX et al., 2006), a análise computadorizada consegue correlacionar esse parâmetro com os outros parâmetros de qualidade do movimento, demonstrando suas analogias. Valores maiores de VAP, VSL, VCL e ALH, por exemplo, podem estar relacionados com a capacidade de fecundação de oócitos, sendo fatores determinantes para a PIVE e IA. LIN e BCF estão ligados a capacidade de migração e penetração no muco cervical do aparelho reprodutor feminino e consequentemente a taxa de prenhez, sendo análises importantes que podem servir de suporte para as técnicas de reprodução assistida (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

Dessa maneira acredita-se que a própolis nas concentrações avaliadas não tenha efeito significativo nos parâmetros relacionados à motilidade espermática. Enquanto que o contato dos espermatozoides felinos com o plasma seminal possivelmente resulte em incremento da motilidade.

4.4. VIGOR, INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA E CONDENSAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA

Os resultados do vigor espermático (Tabela 3) não apresentaram variações ($p > 0,05$) dos tratamentos dentro de um mesmo grupo e nem entre os grupos, com exceção do tratamento P1 do grupo “Descongelado”, que apresentou uma redução quando comparado com a amostra fresca ($p < 0,05$). Os parâmetros de funcionalidade de membrana, viabilidade de membrana e análise de condensação da cromatina não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos da criopreservação (amostra fresca, amostra resfriada e amostra descongelada) e tampouco entre os tratamentos com a própolis (Tabela 3), podendo indicar que essas

variáveis não foram influenciadas pelas modificações físicas da temperatura e nem pelas concentrações do extrato de própolis testadas.

Tabela 3 – Características das amostras por grupos (Amostra Fresca, Amostra Resfriada e Amostra Descongelada) e tratamentos (Controle, P1, P2 e P3) para as variáveis de vigor, funcionalidade de membrana, integridade de membrana e condensação da cromatina.

Tratamento	Vigor	HOST (% membranas funcionais)	Viabilidade (% membranas íntegras)	Cromatina (% cromatinas condensadas)
FRESCO	3,17 ± 0,41	70,00 ± 14,4	40,50 ± 20,67	99,70 ± 0,73
Resfriado	Controle	2,17 ± 1,33	65,83 ± 10,53	47,83 ± 14,37
	P1	3,00 ± 0,63	66,33 ± 12,74	46,67 ± 14,13
	P2	2,67 ± 0,82	70,67 ± 6,68	40,00 ± 12,77
	P3	2,50 ± 0,84	70,50 ± 8,73	46,33 ± 20,13
Descongelado	Controle	2,17 ± 1,33	49,17 ± 11,05	36,5 ± 17,26
	P1	1,83 ± 0,98 ^a	54,67 ± 15,53	38,00 ± 6,32
	P2	2,00 ± 1,09	61,33 ± 9,75	32,67 ± 6,95
	P3	2,33 ± 1,03	50,50 ± 17,85	40,33 ± 10,29

P1: concentração de própolis a 0,1 mg/mL; P2: concentração de própolis a 0,3 mg/mL; P3: concentração de própolis a 0,6 mg/mL; Controle: Sem adição de própolis. 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, P1, P2, e P3). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn e teste de Mann-Whitney (para o parâmetro de vigor) ($p < 0,05$).

A avaliação da funcionalidade de membrana, através do teste hiposmótico, apresentou valores variando entre 49,17% e 70% de espermatozoides com membrana funcional, considerando todos os grupos e tratamentos (Tabela 3). A partir do teste de viabilidade de membrana com a coloração supravital azul de bromofenol foram obtidos valores de membranas íntegras entre 32,67% e 47,83%, considerando todos os grupos e tratamentos (Tabela 3). Com relação à condensação da cromatina foram realizadas apenas as análises da amostra fresca e descongelada, visto que a variação observada na literatura para outras espécies era mínima, obtendo uma variação de 99,5% a 99,9% de células espermáticas com cromatina condensadas (Tabela 3).

Em estudos utilizando amostras espermáticas frescas foram encontrados valores de vigor espermático entre 3,5 e 4,7 (EMERENCIANO, 2013; LIMA; 2015; MACENTE, 2012), superiores ao valor de 3,17, obtido nesse estudo. De maneira similar, para amostras resfriadas e descongeladas relatou-se valores de 3,7 e 2,4, respectivamente (MACENTE, 2012). Essa

diferença pode ser explicada pela subjetividade da análise, além de ser um parâmetro qualitativo e de pequena escala.

A literatura relata valores da funcionalidade de membrana em amostras frescas, que variam de 65,4%, até 79,9% de membranas funcionais (EMERENCIANO et al., 2013; MACENTE, 2014; LIMA, 2015), valores semelhantes aos obtidos no presente estudo. Já para o parâmetro da viabilidade foi descrito o intervalo de 41,7% até 43,0% (VILLAYERDE, 2007; EMERENCIANO et al., 2013), valores semelhantes aos obtidos nesse estudo. No entanto, Macente (2014), encontrou valor consideravelmente superior de 74,5 % de membranas viáveis. Acredita-se que essa diferença seja uma influência do diluidor utilizado (Botu-Crio®), visto que essa influência sobre a viabilidade da membrana espermática já foi relatada em outros estudos (CRESPILHO et al., 2006; FELIPE-SILVA et al., 2011; SNOECK; HENRY; MELO, 2007).

A membrana plasmática do espermatozoide possui funções ativas no processo de fertilização como a capacitação, reação acrossômica, hiperativação da motilidade e interação com a membrana plasmática do oócito, dessa maneira a utilização de técnicas como a integridade e a funcionalidade da membrana são essenciais para avaliar a viabilidade das células espermáticas que serão utilizadas em diferentes biotécnicas reprodutivas (GADELLA et al., 2001).

Não foram encontrados dados da condensação da cromatina para a espécie *F. catus*. No entanto, Barros (2007) avaliou através de eletroforese e teste cometa a fragmentação do material genético de *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato-pequeno), encontrando valores inferiores de cromatina intacta, variando entre 52,89% e 60,44%. Acredita-se que essa diferença de valores se deva ao padrão da espécie ou a maior sensibilidade dos testes utilizados, pois estes testes além de avaliar a condensação, analisam a fragmentação do material genético. A cromatina espermática é um aglomerado de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas que se localizam no interior do núcleo do espermatozoide. O grau de compactação dessas moléculas é importante para a transmissão dos caracteres genéticos de descendência. Grande parte dos espermatozoides maturados possui cromatina compactada, no entanto, fatores genéticos, ambientais, nutricionais, fisiológicos e a idade podem levar a alterações como a descompactação e fragmentação da cromatina que estão associadas a defeitos genéticos na prole (COURTENS; LOIR, 1981).

A partir desses resultados pôde-se evidenciar que as concentrações da própolis testadas não alteraram de maneira significativas nenhum dos parâmetros avaliados.

4.5. MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Os resultados obtidos do percentual de células que apresentaram morfologia normal e a classificação dos defeitos estão apresentados na Tabela 4. A porcentagem de células normais variou entre 39,92% e 66,08% dentro de todos os tratamentos e grupos analisados.

Tabela 4 – Morfologia e classificação dos defeitos espermáticos de gato por grupos (Amostra Fresca, Amostra Resfriada e Amostra Descongelada) e tratamentos (Controle, P1, P2 e P3).

Tratamento		Morfologia (% céls. normais)	DC %	DP %	DK %
FRESCO		53,42 ± 26,14	81,56 ± 20,79	9,36 ± 7,16	9,07 ± 16,06
Resfriado	Controle	61,75 ± 19,96	78,48 ± 13,69	14,14 ± 11,68	7,38 ± 3,51
	P1	57,45 ± 19,93	80,14 ± 13,27	14,96 ± 11,43	4,90 ± 4,12
	P2	39,92 ± 4,64 ^A	91,92 ± 6,5	5,71 ± 4,64	2,37 ± 2,87
	P3	64,33 ± 20,73	77,65 ± 14,41	9,95 ± 4,11	12,41 ± 11,19
Descongelado	Controle	66,08 ± 10,32	85,60 ± 7,03	8,01 ± 4,38	6,39 ± 7,85
	P1	47,75 ± 10,72 ^A	88,01 ± 5,20	7,31 ± 4,42	4,68 ± 5,45
	P2	46,83 ± 7,39 ^A	91,60 ± 7,18	5,15 ± 5,93	3,25 ± 2,65
	P3	65,75 ± 16,39	82,31 ± 8,41	10,98 ± 7,92	6,71 ± 6,02

P1: concentração de própolis a 0,1 mg/mL; P2: concentração de própolis a 0,3 mg/mL; P3: concentração de própolis a 0,6 mg/mL; Controle: Sem adição de própolis; DC: Defeitos de cauda; DP: Defeitos na peça intermediária; DK: Defeitos 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, P1, P2, e P3). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn ($p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos da curva de criopreservação, demonstrando que não há relação entre a submissão das células a congelamento e alterações morfológicas. No entanto, a comparação entre o controle e os tratamentos dentro de um mesmo grupo mostrou que no grupo “Resfriado”, o tratamento P2 reduziu a porcentagem de células com morfologia normal para 39,92%, e no grupo “Descongelado”, os tratamentos P1 e P2 também apresentaram essa redução ($p < 0,05$). De maneira geral, acredita-se que menores proporções de própolis afetam negativamente a morfologia espermática, diferente do observado no tratamento P3 que manteve resultado semelhante ao do grupo controle (Tabela 4).

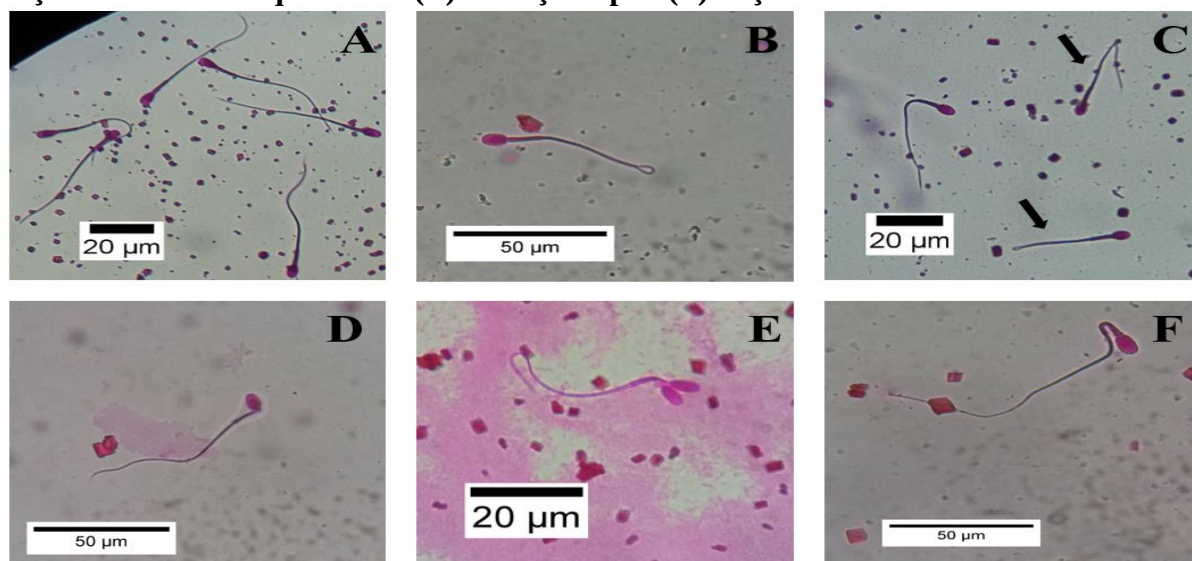
Os resultados das amostras espermáticas para o parâmetro de morfologia estão de acordo com os resultados encontrados na literatura. Sendo relatadas porcentagens de células com morfologia normal para as amostras recuperadas do epidídimo: amostra fresca entre 56,8

% e 62,8 % (COCCHIA et al., 2009; FLORINDO, 2011; MACENTE et al., 2012); amostra resfriada 62,1 % (MACENTE et al., 2011); amostra criopreservada entre 40% e 47,2 % (VILLAYERDE, 2007; COCCHIA et al., 2009). Diferindo apenas de valores encontrados para a amostra seminal fresca, com 84,2 % de espermatozoides com morfologia normal (VILLAYERDE, 2007).

Dentre as amostras analisadas, apenas o tratamento P2 (39,92%) do grupo resfriado apresentou um percentual de alterações morfológicas fora do padrão de normalidade para gatos, sendo o valor mínimo de referência de 40% de células normais. O restante dos valores obtidos está dentro dos limites aceitáveis, sendo então considerados normozpérmicos (JEWGENOW et al., 2009; ZAMBELLI; LEVY, 2010).

O percentual de células com alterações morfológicas foi separado em alterações na cauda, peça intermediária e cabeça (Tabela 4 e Figura 4). Nesses parâmetros não foram observadas variações ($p > 0,05$) entre os grupos da curva de criopreservação e entre os tratamentos. Através desses resultados pode-se deduzir que as alterações morfológicas não estão associadas nem as mudanças físicas da criopreservação nem as concentrações do extrato da própolis, podendo essas estar relacionada a fatores genéticos e/ou fisiológicos (FLORINDO, 2011). Os defeitos de cauda são os mais comuns variando entre 77,65% e 91,92%, seguidos dos defeitos de peça intermediária (5,15% e 14,96%) e por último os defeitos de cabeça (2,37% e 12,41%). Essa mesma proporção foi relatada por Macente et al. (2012).

Figura 4 – Análise morfológica de espermatozoides epididimários de gato. (A) Espermatozoides com morfologia normal. (B) Cauda enrolada. (C) Cauda quebrada. (D) Peça intermediária quebrada. (E) Cabeça dupla. (F) Peça intermediária dobrada.



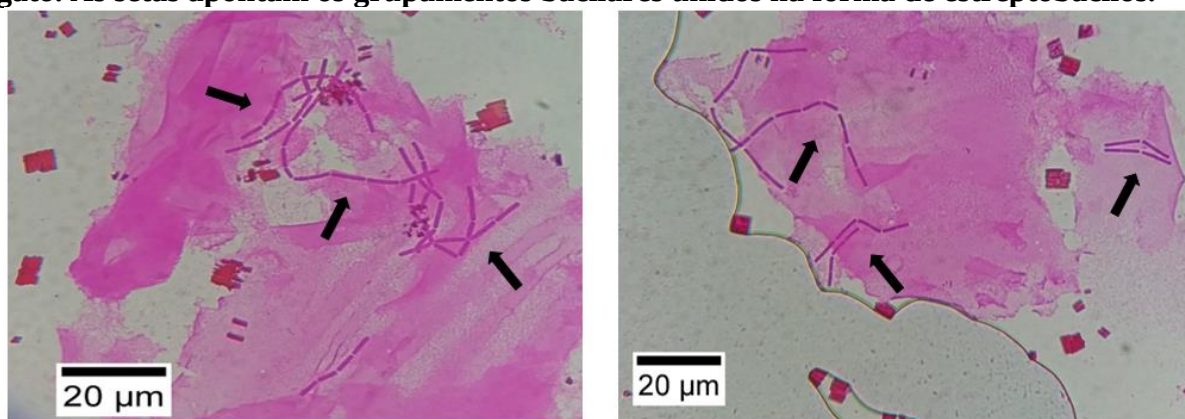
Fonte: acervo do autor.

A morfologia espermática é uma técnica importantíssima para avaliar a fertilidade de um animal de acordo com a concentração de células normais em uma amostra. Estando diretamente ligada com a capacidade de fecundação do oócito pelo espermatozoide, visto que espermatozoides com morfologias alteradas têm viabilidade e a qualidade do movimento afetado. No entanto, esse parâmetro não é capaz de mensurar com precisão a funcionalidade da célula espermática, por isso é importante que esteja associada a outras técnicas como a análise CASA (ARRUDA et al., 2011).

4.6. EFEITO ANTIMICROBIANO

Dentre as 11 amostras analisadas, em 3 delas foram observadas células não espermáticas com movimento progressivo e espiral, que possuíam morfologia bacilar. Por vezes, essas células tendiam a se agrupar em conjuntos com mais de 3 unidades celulares, gerando a morfologia semelhante aos micro-organismos estreptobacilos (Figuras 5 e 6). Acredita-se, que seja uma contaminação proveniente da gema do ovo, produto no qual já são relatadas contaminações por bactérias do gênero *Salmonella* ssp. (OLIVEIRA; SILVA, 2000) e *Pseudomonas* ssp. (MENDES et al., 2014) por exemplo, que possuem agrupamentos morfológicos semelhantes. Algumas dessas células permaneceram móveis durante toda a cadeia da curva de criopreservação (amostra fresca, resfriada e descongelada).

Figura 5 - Micro-organismos observados na análise morfológica de espermatozoides de gato. As setas apontam os grupamentos bacilares unidos na forma de estreptobacilos.

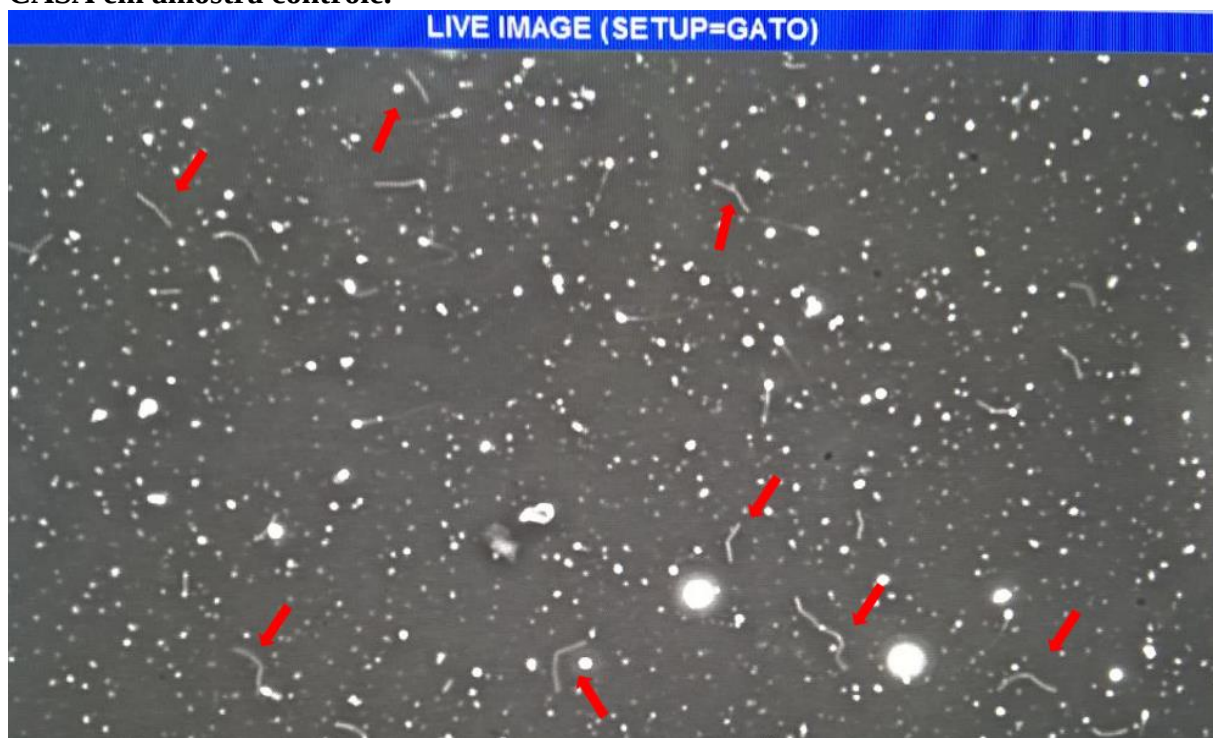


Fonte: acervo do autor.

Vale ressaltar que foi utilizada a mesma gema de ovo no preparo do meio crioprotetor controle e tratamentos contendo própolis. No entanto, apenas os grupos controle apresentaram

a presença dos micro-organismos bacilares. Acredita-se então que todos os tratamentos com as diferentes concentrações de própolis apresentaram efeitos na redução da multiplicação celular ou eliminação desses organismos, visto que os tratamentos foram acrescidos com própolis desde o início do preparo dos meios e que há relatos do efeito antimicrobiano da própolis na literatura (CEDIKOVA et al., 2014).

Figura 6 - Micro-organismos bacilares visualizados através do software da análise CASA em amostra controle.



Fonte: acervo do autor.

5. CONCLUSÕES

As células espermáticas epididimárias conseguem manter boas taxas de motilidade quando submetidas ao teste de toxicidade com diferentes concentrações do extrato da própolis. Nenhuma das concentrações do extrato teve efeitos significativos sobre os parâmetros espermáticos de funcionalidade e integridade da membrana, condensação da cromatina e na classificação dos defeitos morfológicos.

O tratamento P3 (0,6 mg/mL de própolis adicionados no TRIS) foi considerado o mais promissor na manutenção da morfologia espermática normal e da motilidade das amostras resfriadas. Apesar das concentrações avaliadas da própolis não apresentarem benefícios na manutenção da motilidade total e progressiva dos espermatozoides epididimários de *F. catus* após o procedimento de criopreservação, esta substância natural se mostrou como um importante componente do meio, potencialmente atuando na inibição do crescimento de micro-organismos contaminantes. Essa afirmação é reforçada pelo fato da própolis tampouco apresentar efeito tóxico nas concentrações avaliadas.

No entanto, como esse trabalho é pioneiro na utilização dessa substância na conservação de espermatozoides felinos, ainda são necessários 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.

REFERÊNCIAS

- ANGRIMANI, D. S. R. et al. Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 4, p. 323-327, 2013.
- ARAÚJO, A. M. S. Plasma Seminal (Revisão). **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 18, p. 1-10, 2014.
- ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.3-Statistical applications in the areas of biomedical sciences**. Belém: Civil Society Mamiraua, 2007.
- BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (Leopardus tigrinus, SCHREBER, 1775)**. 120f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2007.
- 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.
- BRASIL. Lei 11.794/2008 (Lei Ordinária) 08/10/2008. Regulamenta o inciso VII do par. 1º do art. 225 da constituição federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 09/10/2008.
- BONAURA, M. C. et al. Alteraciones ultramicroscópicas observadas en espermatozoides felinos (*Felis catus*) congelados-descongelados. **Revista Ciências Morfológicas**, v. 15, n.2, 2013.
- CAPUCHO, C. et al. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 11, p. 3956-3962, 2012.
- CEDIKOVA, M. et al. Effects of the czech propolis on sperm mitochondrial function. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- 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.
- 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, 2009.
- COURTENS, J. L.; LOIR, M. The spermatid manchette of mammals: formation and relations with the nuclear envelope and the chromatin. **Reproduction Nutrition Development**, v. 21, p. 467-477, 1981.

COX, J. F. et al. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p. 860-867, 2006.

CRESPILHO, A. M. et al. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 229-235, 2006.

DA SILVA, T. F. P.; ACKERMANN, C. L.; SILVA, L. D. M. Desafios para o desenvolvimento da tecnologia da criopreservação de sêmen felino. **Anais do VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal**, 2012, Fortaleza, CE, Brasil.

DA 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.

DE CASTILHO, E. F. **Uso da Própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino**. 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Viçosa, Minas Gerais, 2008.

DECO, T. S. et al. Coleta e avaliação de sêmen de pumas (*Puma concolor Linnaeus*, 1771) adultos mantidos em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.4, p.252-259, 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.

DE SOUSA, J. P. B. et al. Seasonality role on the phenolics from cultivated *Baccharis dracunculifolia*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2009.

DOS SANTOS, F. C. C. **Utilização de extrato de própolis verde no resfriamento de sêmen equino**. 30 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Pelotas, Rio Grande do Sul, 2014.

ELMAZOU DY, R. H.; ATTIA, A. A.; EL-SHENAWY, N. S. Protective role of propolis against reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rats. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 101, n. 3, p. 175-181, 2011.

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.

ENDLER, A. L.; OLIVEIRA, S. C.; AMORIM, C. A.; CARVALHO, M. P.; PILEGGI, M. Teste de eficácia da própolis no combate a bactérias patogênicas das vias respiratórias. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 9, n. 2, p. 17-20, 2003.

FELIPE-SILVA, A. S. et al. Efeitos do diluidor na viabilidade espermática pós-criopreservação em tourinhos da raça Gir Leiteiro aos 25 meses de idade, pré-selecionados

pela classificação andrológica por pontos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.1, p.81-86, 2011.

FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 294-297, 2006.

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**. 58 f. Dissertação (Mestrado integrado em medicina veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2011.

GADELLA, B. M. et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-265, 2001.

GARCIA, P. V. et al. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. **Fertility and sterility**, v. 97, n. 6, p. 1444-1451, 2012.

GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p. 169-180, 2012.

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: **03 de Agosto de 2016**.

JEWGENOW, K. et al. Reduced germ cell apoptosis during spermatogenesis in the teratospermic domestic cat. **Journal of Androloly**, v. 30, p. 460-468, 2009.

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.

JIMÉNEZ, E. et al. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 265-269, 2011.

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

LIMA, D. B. C. **Espermatozoides epididimários de gatos domésticos: avaliação após refrigeração e diluição em água de coco em pó (ACP-117c)**. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.

LIMA, D. B. C. et al. Avaliação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos após recuperação com ACP-117C ou tris, adição de gema e refrigeração a 4 °C por 24h. **Ciência Animal**, v. 24, n. 1, p. 03-10, 2014.

LUSTOSA, S. R. **Padronização de extrato de própolis e avaliação da atividade antimicrobiana**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pernambuco, 2007.

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

LUVONI, G. C. et al. Conservation of feline semen: Part I: Cooling and freezing protocols. **Journal of feline medicine and surgery**, v.5, p.203-208, 2003.

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, B. I. **Congelação de células espermáticas provenientes de epidídimo de gatos domésticos contendo antioxidante no meio diluidor**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), Jaboticabal, 2014.

MAGALHÃES, L. C. O. **Uso de sêmen liofilizado de gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) para a produção in vitro de embriões através da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)**. 109 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP), Botucatu, 2013.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

MARTÍNEZ-PASTOR, F. et al. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. **Theriogenology**, v. 75, p. 783-795, 2010.

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.

MATTOS, L. M. **Biotecnologias em reprodução assistida na preservação de animais silvestres em extinção**. 45 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2001.

MELO, C. C. S. et al. *Aloe vera* sp. is an acceptable alternative to egg yolk for preserving goat semen at 4 °C. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, suppl.4, p.433, 2012.

MENDES, F. R. et al. Qualidade bacteriológica de ovos contaminados com *Pseudomonas aeruginosa* e armazenados em temperatura ambiente ou refrigerados. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.15, n.4, p. 444-450, 2014.

MOTA-FILHO, A. C. **Conservação de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de cães**. 78 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2014.

MOTA-FILHO, A. C.; SILVA, L. D. M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Fortaleza, v. 5, n. 1, p.1-8, 2012.

NASCIMENTO, A. L. C. et al. Atividade antioxidante do extrato aquoso de noni em diluente para congelamento de sêmen ovino. **Boletim de Indústria Animal**, v. 73, n. 1, p. 68-74, 2016.

ÖGRET MEN, F.; INANAN, B. E.; ÖZTÜRK, M. Protective effects of propolis on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. **Cryobiology**, v. 68, p. 107-112, 2014.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 6, p. 655-661, 2000.

PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 1-17, 1998.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

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.

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.

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.

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, S. V. et al. Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão. **Ciência veterinária nos trópicos**, Recife-PE, v. 12, nº 1/2/3, p. 1-15, 2009.

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

SNOECK, P. P. N.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.56-64, 2007.

SALAMON, S.; VISSER, D. Effect of composition of TRIS-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. **Australian Journal Biological Science**, v. 25, p. 605-618, 1972.

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.

Statsoft INC. Program Statistica Version 8.0, 2007. Disponível em: <
<http://www.statsoft.com/>>.

TSUTSUI, T. et al. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **Journal Veterinary Medical Science**, v.65, p.397-399, 2003.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

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, A. I. S. B. **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.

WAURICH, R. et al. Embryonic gene activation *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 fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. **Theriogenology**, v. 73, n. 7, p. 886-892, 2010.

ZAMBELLI, D.; LEVY, X. Clinical approach to the infertile male. In: ENGLAND, G.; VON HEIMENDAHL, A. **BSAVA Manual of canine and feline reproduction and neonatology**. 2. ed. England: British Small Animal Veterinary Association, 2010. p. 70-79.

ANEXO 1

Figura 7 - Valores do setup estabelecido para a avaliação do sêmen do gato doméstico no sistema HTR–IVOS-10, Botucatu, 2007.

ANALYSIS SETUP #7: Gato

Apply Sort: 0
 Frames Acquired: 50
 Frame Rate: 60 Hz
 Minimum Contrast: 30
 Minimum Cell Size: 3 Pixels
 Minimum Static Contrast: 30
 Straightness (STR), Threshold: 80,0 %
 Vap Cutoff: 30,0 $\mu\text{m/s}$
 Prog. Min VAP: 70,0 $\mu\text{m/s}$
 VSL Cutoff: 20,0 $\mu\text{m/s}$
 Cell Size: 8 Pixels
 Cell Intensity: 80
 Static Head Size: 0,80 to 5,21
 Static Head Intensity: 0,49 to 1,68
 Static Elongation: 22 to 84
 Slow Cells Motile: YES
 Magnification: 1,89
 Video Frequency: 60
 Bright Field: NO
 LED Illumination Intensity: 2220
 IDENT Illumination Intensity: 3000
 Temperature, Set: 37,0 °C
 Chamber depth: 20,0 μm
 Chamber position: 3,9 mm
 Chamber position B: 11,8 mm
 Chamber position C: 18,7 mm
 Chamber position D: 26,6 mm
 Chamber type: Leja4
 Field Selection Mode: SELECT
 IDENT Fluorescent Option: OFF
 Integrating Time: 1 Frames
 Remote image recall: NO

Fonte: Villaverde, 2007.