

BIOTECNOLOGIAS NA PRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES FELINOS

(Biotechnologies in the preservation of feline sperm)

Maria Isabel Mello MARTINS* ; Ana Beatriz Marques de ALMEIDA; Myrian Megumy Tsunokawa HIDALGO

Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida da Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid – PR 445, Km 380, Campus Universitário, Londrina/PR. CEP: 86.057-970. *E-mail: imartins@uel.br

RESUMO

O gato doméstico é a única espécie da família Felídea sem risco ou iminência de extinção, diferente da maior parte dos felinos selvagens. Desta forma, o desenvolvimento e aprimoramento de diferentes biotécnicas reprodutivas, é essencial para a manutenção da qualidade reprodutiva, tendo em vista a preservação de espécies mais vulneráveis. Além disso, as biotécnicas do sêmen são para as tecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial (IA) e a fertilização *in vitro* (FIV). Sendo assim, o objetivo deste compilado bibliográfico foi abordar as principais técnicas de colheita, análise e preservação de sêmen/espermatozoides felino, assim como o uso dessas células em IA e FIV. Para a colheita do sêmen felino, diferentes métodos têm sido aplicados: ejaculação farmacológica, eletroejaculação e vagina artificial. Em caso de óbito do reprodutor, os espermatozoides recuperados do epidídimo também apresentam viabilidade reprodutiva. Ademais, a cinética espermática avaliada pelo sistema CASA, a morfologia e a morfometria são as principais análises que demonstram a qualidade espermática e refletem na fertilidade do ejaculado. O sistema CASA também avalia a trajetória individual de cada espermatozoide, que ao se agrupar em clusters, demonstra a heterogeneidade do ejaculado nas subpopulações. Contudo, os diluentes para a conservação e refrigeração dos espermatozoides felinos e as curvas de congelamento ainda não estão totalmente estabelecidos e influenciam diretamente a viabilidade dos espermatozoides criopreservados. Diante disso, os resultados da utilização do sêmen felino após criopreservação são inconsistentes, sendo necessários mais estudos para elucidar melhores curvas de congelamento e meios de diluentes para viabilizar a preservação do material genético dos gatos.

Palavras-chave: Sistema CASA, gatos, biotecnologia do sêmen, subpopulações espermáticas.

ABSTRACT

The domestic cat is the only species of the Felidae family without risk or imminence of extinction, unlike most wild cats. Therefore, the development and improvement of different reproductive biotechnologies are essential for the maintenance of reproductive quality for the preservation of the most vulnerable species. Furthermore, semen biotechnologies are the basis for reproductive technologies such as artificial insemination (AI) and in vitro fertilization (IVF). Thus, the objective of this bibliographic compilation was to approach the main techniques of collection, analysis, and preservation of feline semen/sperm, as well as the use of these cells in AI and IVF. For feline semen collection, different methods have been applied: pharmacological ejaculation, electroejaculation, and artificial vagina. In case of death of the sire, sperm recovered from the epididymis also show reproductive viability. Moreover, the sperm kinetics evaluated by the CASA system, the morphology, and the morphometry are the main analyzes that demonstrate sperm quality and reflect on ejaculate fertility. The CASA system also evaluates the individual path of each sperm, which, when grouped into clusters, demonstrates the heterogeneity of the ejaculate in the subpopulations. However, diluents for the conservation and refrigeration of feline sperm and freezing curves are not yet fully established and directly influence the viability of cryopreserved sperm. Therefore, the results of using feline semen after cryopreservation are inconsistent, and further studies are needed to elucidate better freezing curves and diluents to enable the preservation of the genetic material of cats.

Keywords: CASA system; cats; semen biotechnology, sperm subpopulations.

INTRODUÇÃO

O gato doméstico é considerado modelo experimental para os felinos selvagens

Recebido: nov./2021.

Publicado: jun./2022.

(PROCHOWSKA e NIZAŃSKI, 2017). Neste contexto, o desenvolvimento das biotécnicas reprodutivas, como a criopreservação dos espermatozoides, permite a conservação do material genético por períodos indefinidos e sua posterior utilização na reprodução assistida (CHATDARONG, 2017). Contudo, durante o processo de criopreservação, a célula espermática é submetida a fatores estressantes que interferem na viabilidade espermática (CHEUQUEMÁN *et al.*, 2018). Frente a isso, é indispensável o aprimoramento dos protocolos e incremento dos diluentes comerciais já utilizados com intuito de melhorar a qualidade espermática pós-descongelamento, com destaque para o avanço nos protocolos específicos para espermatozoides provenientes do epidídimo (BRUSENTSEV *et al.*, 2018; HERMANSSON e AXNÉR, 2007).

A avaliação *in vitro* dos espermatozoides é primordial na predição da qualidade reprodutiva do animal (BATISTA e GUERRA, 2010), pois permite estimar os danos causados aos gametas pela criopreservação, bem como norteia a escolha do protocolo, do diluente e do crioprotetor mais adequado e eficiente para a proteção da célula (CARDOSO *et al.*, 2010). Dentro da análise do sêmen, inclui-se: a avaliação da morfologia e da morfometria espermática, as quais fornecem informações importantes que podem se correlacionar com a fertilidade (DE PAZ *et al.*, 2011) e a criorresistência (RAMÓN *et al.*, 2013); e a análise computadorizada do sêmen (*Computer-Assisted Semen Analysis- CASA*), que é capaz de aferir inúmeros parâmetros cinéticos (KATHIRAVAN *et al.*, 2011; VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Sabe-se que o ejaculado do mamífero é um composto heterogêneo com diferentes subpopulações espermáticas, as quais apresentam respostas variadas quanto aos padrões de motilidade (QUINTERO-MORENO *et al.*, 2003). Embora o sistema CASA permita a identificação da cinética das células espermáticas e o registro individual de sua trajetória, geralmente são utilizados valores médios da cinética espermática, assumindo que o ejaculado é uniforme, o que causa perda de informações importantes (AMANN e WABERSKI, 2014; BARBAS *et al.*, 2018). Assim, estudos que identifiquem as subpopulações são relevantes, visto que, a variação na prevalência das subpopulações pode estar relacionada às alterações fisiológicas das células espermáticas e estar associada à variação individual do macho, a fertilidade e a resposta à criopreservação (NÚÑEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2018).

Assim, este compilado literário visa abordar os principais métodos de colheita do sêmen de gatos domésticos; ressaltar as formas de preservação de espermatozoides felinos; debater os diluentes para a refrigeração e congelamento de células espermáticas; e, finalmente, apresentar os resultados obtidos com uso do sêmen felino preservado nas biotécnicas reprodutivas.

DESENVOLVIMENTO

Coleta de sêmen

A coleta de sêmen, em felinos, apresenta muitos desafios dentro da reprodução assistida, uma vez que o volume do ejaculado é baixo e a amostra colhida precisa ser suficientemente preservada para a análise espermática, inseminação ou criopreservação (JOHNSON, 2018).

Recebido: nov./2021.

Publicado: jun./2022.

Dentre as opções de coleta de sêmen em felídeos, a eletroejaculação ainda é a técnica mais aplicada. Para a realização dessa técnica, diferentes protocolos de estímulos elétricos têm sido reportados (WILDT *et al.*, 1983; HOWARD *et al.*, 1981, 1990, 1993; MARTINS *et al.*, 2016), no entanto, o mais utilizado consiste na aplicação de três séries de estímulos (30, 30, 20) de 2 a 6 volts, com intervalo de cinco minutos entre as séries (HOWARD, 1993). Em grandes felinos, a última série de estímulos pode chegar a 6 volts, caso não consiga a coleta com estímulos em 5 volts, entretanto, o risco de contaminação por urina aumenta em altas voltagens (PAZ *et al.*, 2000). Uma variação de protocolo de eletroejaculação foi descrita por Martins e colaboradores (2016), em que 80 estímulos foram aplicados em 3 séries (30, 30, 20) de 2 a 3 volts, com descanso de cinco minutos entre as séries. Este protocolo demonstrou eficiência na coleta de sêmen em pequenos e grandes felinos utilizando estímulos de baixas voltagens, com a vantagem de diminuir o risco de contaminação por urina.

A eletroejaculação exige anestesia geral, equipamento específico e treinamento da equipe (MARTINS e JUSTINO, 2015). Desta forma, diversos protocolos anestésicos têm sido descritos em gatos domésticos e grandes felídeos, como: cloridrato de cetamina e xilazina (MORAES *et al.*, 2002); cetamina isolada ou associada à medetomidina (ZAMBELLI *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2018); ou protocolos com associação de tiletamina e zolazepam (MORAES *et al.*, 2002; MORATO *et al.*, 2002; TEBET *et al.*, 2006) e zolazepam, tiletamina e morfina (TEBET *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011; ACKERMANN *et al.*, 2013). No entanto, os fármacos podem provocar o relaxamento do colo vesical, e, quando são aplicadas altas voltagens (8 volts), podem resultar em micção e contaminação do sêmen (HOWARD, 1993; JOHNSON, 2018). As diferentes associações em doses variáveis tornam difícil a comparação da eficiência entre os protocolos mais utilizados (SILVA *et al.*, 2011), deste modo, a associação de tiletamina e zolazepam tem sido preconizada para a eletroejaculação por não determinar alterações significativas no ejaculado (PAZ, 2019).

A coleta do sêmen com vagina artificial possui vantagens: tem baixo custo, pode ser realizada em um macho não anestesiado e permite que a ejaculação seja completa (JOHNSON, 2018). No entanto, para a utilização dessa técnica é necessário um período de treinamento do animal de duas a três semanas, e, em alguns casos, até meses para que o animal se condicione e consiga produzir ejaculados consistentes, o que não ocorre com todos os machos (JOHNSON, 2018). Geralmente, são utilizadas fêmeas no estro, mas o macho também pode ser treinado com uma gata submissa, castrada ou não, que aceite a monta, ou com um manequim de pelúcia (MARTINS e JUSTINO, 2015).

Um outro método, a coleta por cateterização uretral ou ejaculação farmacológica, tornou-se promissor, e consiste na introdução de uma sonda uretral fina, após a sedação do animal com $\alpha 2$ agonista (medetomidina ou dexamedetomidina), que permite a eliminação uretral de espermatozoides sem que haja ejaculação completa, uma vez que promove a contração dos ductos deferentes, do trigono vesical e do esfíncter da bexiga durante a ejaculação (ZAMBELLI *et al.*, 2008). Os melhores resultados com a cateterização uretral foram alcançados quando houve maior dose de sedação (130 μ g/kg) e um único cateterismo realizado, logo após a sedação máxima ser atingida (CUNTO *et al.*, 2015). Entretanto, essa técnica tem a necessidade de sedação do macho e obtém baixo volume de ejaculado, com aproximadamente 20 μ L (ZAMBELLI *et al.*, 2008).

A recuperação espermática da cauda do epidídimo ocorre quando se deseja preservar o material genético de um animal que veio a óbito, e é de suma importância para os avanços nas pesquisas de preservação do gameta, principalmente para animais selvagens em risco de extinção, visto que esses espermatozoides recuperados podem ser criopreservados e utilizados nas biotecnologias da reprodução assistida (LUVONI e MORSELLI, 2017). A obtenção dos espermatozoides pode ser realizada por diversas abordagens, como: técnica de flutuação, na qual o epidídimo é seccionado, em contato com o meio de recuperação, e os fragmentos são mantidos em repouso para favorecer a migração dos espermatozoides para o meio (LIMA e SILVA, 2017); fluxo retrógrado, na qual uma agulha ou cateter é inserido no canal deferente e um meio de recuperação é utilizado para lavar o conteúdo da cauda do epidídimo em um tubo plástico ou placa de petri (ANGRIMANI *et al.*, 2013); fatiamento, na qual a cauda do epidídimo é fragmentada e comprimida simultaneamente, promovendo o extravasamento do fluido epididimário para o exterior; e técnica de compressão da cauda do epidídimo e ducto deferente, em que o epidídimo e o ducto deferente são ordenhados com auxílio de pinças hemostáticas, e a amostra é recuperada em placa de petri (MOREIRA, 2017).

Análise da cinética e subpopulações espermáticas

A motilidade espermática é a característica mais importante na predição do potencial de fertilidade, visto que é o parâmetro mais afetado dentro do processo de congelação e descongelação da amostra, o que torna essa avaliação fundamental na escolha do melhor protocolo de criopreservação (CHEUQUEMÁN *et al.*, 2018).

Para reduzir a subjetividade na avaliação da motilidade espermática, adotou-se o uso da análise computadorizada de sêmen (sistema CASA), que permite a identificação da cinética espermática e o registro individual de sua trajetória (MARTINS e JUSTINO, 2015). Entretanto, existe uma subutilização desse equipamento, pois as análises fornecidas pelo CASA são baseadas em valores médios da cinética espermática, assumindo que, no ejaculado, as células espermáticas possuem movimento uniforme, o que pode mascarar os efeitos de vários tratamentos sobre os espermatozoides, não levando em consideração a variabilidade intrínseca do ejaculado (AMANN e WABERSKI, 2014; BARBAS *et al.*, 2018).

Atualmente, a existência de subpopulações no ejaculado já é reconhecida, ou seja, considera-se o ejaculado do mamífero heterogêneo, demonstrando que as várias subpopulações representam espermatozoides em estados fisiológicos diferentes, que alteram seu comportamento em resposta às alterações ambientais e de armazenagem (QUINTERO-MORENO *et al.*, 2003; HOLT e LOOK, 2004; SOUZA *et al.*, 2018). Para identificar todas as informações relevantes com mais acurácia, estudos propuseram o uso de *softwares* específicos e procedimentos estatísticos multivariados para investigar melhor o ejaculado das espécies. Esta análise multivariada identifica as subpopulações espermáticas, utilizando dados da cinética espermática, obtidos de cada animal por procedimento de agrupamento/clusters. Resumidamente, nessa técnica, os dados são extraídos, e são identificados os parâmetros cinéticos que compõem os componentes principais, os quais influenciam em menor ou maior grau os resultados da amostra espermática. A partir daí, os dados da cinética espermática são separados por graus de semelhança, ou seja, são formados os clusters/ subpopulações, em que cada espermatozoide pertence a apenas um cluster. Assim, é possível identificar qual

subpopulação espermática está mais presente na amostra (SOUZA *et al.*, 2018; HIDALGO *et al.*, 2021).

Dessa forma, a análise de clusters fornece dados significativos sobre as características biológicas do espermatozoide e as alterações, comparando espécies (FLORES *et al.*, 2008; VICENTE-FIEL *et al.*, 2013), técnicas de colheita de sêmen (VÁZQUEZ *et al.*, 2015) e mudanças nas características dessas células após a criopreservação (NÚÑEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2006; MUIÑO *et al.*, 2008, 2009; GALLEGO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018).

A determinação das subpopulações espermáticas, detalhadas com base na cinética individual dos espermatozoides, já foi relatada em diferentes espécies animais, como gatos (GUTIÉRREZ-REINOSO e GARCÍA-HERREROS, 2016; SOUZA *et al.*, 2018;), cães (NÚÑEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2006; PEÑA *et al.*, 2012), garanhões (QUINTERO-MORENO *et al.*, 2003), jumentos (FLORES *et al.*, 2008), carneiros (SANTOLARIA *et al.*, 2015; BERGSTEIN-GALAN *et al.*, 2017; BARBAS *et al.*, 2018), bovinos (MUIÑO *et al.*, 2008, 2009; FERRAZ *et al.*, 2014; HIDALGO *et al.*, 2021), entre outros. Os resultados das subpopulações são característicos de cada espécie e os números de subpopulações mais estabelecidos foram três (FLORES *et al.*, 2008; VÁZQUEZ *et al.*, 2015; SANTOLARIA *et al.*, 2015; GALLEGO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018) e quatro (MUIÑO *et al.*, 2008, 2009; PEÑA *et al.*, 2012).

A caracterização das subpopulações espermáticas pode ser indicadora da qualidade dos espermatozoides, visto que células com movimentos rápidos e lineares têm maior resistência à criopreservação e maior probabilidade de fertilização do oócito (FERRAZ *et al.*, 2014). Dessa forma, é possível propor que machos, mesmo com valores de motilidade semelhantes, possam apresentar fertilidade distinta por causa da heterogeneidade do ejaculado (HOLT e LOOK, 2004). Assim, a identificação das subpopulações é relevante para selecionar os machos que possuam maior porcentagem de subpopulações superiores e que se desenvolvam melhor na criopreservação espermática, e que, conseqüentemente, possuam maior potencial de fertilização para serem utilizados na reprodução assistida (MARTINS e JUSTINO, 2015; MARTINS *et al.*, 2017).

Análise da morfologia e morfometria espermática

A morfologia do sêmen felino é um grande desafio aos pesquisadores, pois os gatos apresentam ejaculados teratospérmicos (>60% de espermatozoides com defeitos estruturais) (PENFOLD *et al.*, 2003; AXNÉR e FORSBERG, 2007). Esses ejaculados apresentam espermatozoides mais susceptíveis aos danos causados pela congelação (VILLAVERDE *et al.*, 2008; MARTINS e JUSTINO, 2015), e, desta forma, podem reduzir a possibilidade de prenhez por impedir a ligação do espermatozoide à zona pelúcida do oócito (PENFOLD *et al.*, 2003). A avaliação morfológica é feita por meio da análise estrutural de células espermáticas em preparação úmida ou em esfregaços corados (VILLAVERDE *et al.*, 2008). Axnér e Forsberg (2007), em seu estudo, descrevem que os principais defeitos morfológicos encontrados foram anormalidades de cauda e gotas proximais, além disso, notaram que durante a estação de reprodução felina (primavera e verão) a porcentagem de defeitos espermáticos reduz. Já em outro relato na avaliação de espermatozoides epididimários foi encontrada uma grande porcentagem de defeitos na cauda, mas a maioria das células espermáticas possuía morfologia

Recebido: nov./2021.

Publicado: jun./2022.

normal (67,21%) (BARBOSA *et al.*, 2019).

A morfometria espermática apresenta objetividade, em relação à morfologia, pois mensura cada estrutura do espermatozoide, de forma que, se torna possível identificar características sutis, que não seriam visualizadas convencionalmente (BARBOSA *et al.*, 2019). De acordo com Ramón *et al* (2013), a morfometria de células espermáticas pode ser relacionada à crioresistência e à fertilidade, visto que, durante o processo de criopreservação, ocorre alterações na cabeça espermática, sendo a análise uma importante ferramenta para caracterizar a crioresistência de espermatozoides de animais que são introduzidos em programas de melhoramento. A ferramenta mais avançada para análise morfométrica é o “CASA-Morph” (sistema computadorizado para morfometria de espermatozoides), mas esfregaços corados visualizados em microscopia e mensurados por um *software* também oferecem resultados fidedignos (MAROTO-MORALES *et al.*, 2016). Ademais, já se constatou que o corante utilizado para confeccionar os esfregaços influenciam as dimensões estruturais dos espermatozoides (HIDALGO *et al.*, 2006). Um exemplo disso é o estudo de Barbosa *et al* (2019), que mostrou que os espermatozoides felinos são alongados, com cauda comprida e cabeça pouco menor que a peça intermediária.

Criopreservação do sêmen felino e viabilidade pós-descongelção

As alternativas para criopreservação do sêmen que permitem o transporte das células em baixas temperaturas são: refrigeração (4 a 15 °C) e congelação (-196 °C). A refrigeração, promove menos danos à célula, porém, o período de armazenamento é curto, são horas ou até poucos dias. Em contrapartida, o sêmen congelado tem grande potencial para conservação, visto que pode ser armazenado por tempo indeterminado e transportado a qualquer distância para utilização em técnicas reprodutivas (MARTINS e JUSTINO, 2015).

Para o processo de criopreservação, é necessário um meio diluente que possua: fonte nutritiva para as células, proteção das proteínas da membrana espermática, antibióticos, soluções tampão, antioxidantes para minimizar os níveis de espécies reativas a oxigênio (ROS), e crioprotetores, que previnem a formação de cristais de gelo dentro das células (RAHEJA *et al.*, 2018). No gato doméstico, é preconizado o emprego dos diluentes TRIS (trishidroximetilaminometano) ou TEST (ácido sulfônico N-tris-hidroximetil-metil-2-aminometano), adicionado de frutose ou glicose, não sendo reportadas diferenças entre os dois açúcares quanto à capacidade de manutenção da qualidade espermática antes ou após a criopreservação (JIMÉNEZ *et al.*, 2013; JOHNSON, 2018). Nessa espécie, o crioprotetor, comumente utilizado é o glicerol (VILLAVERDE *et al.*, 2013).

Cabe ressaltar, que o controle da curva de refrigeração é fundamental para que os espermatozoides interajam com os crioprotetores e ocorra a desidratação gradativa da célula, de modo a reduzir as crioinjúrias. Dessa forma, se esse processo não for controlado adequadamente pode ocorrer danos parcialmente irreversíveis à motilidade espermática, alterações em membranas acrossomal e plasmática, diminuição da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares (SAMPAIO e ZÚCCARI, 2016). Em felinos, geralmente, preconiza-se curvas lentas, sendo o arrefecimento a 4 °C por uma hora (BURANAAMNUAY, 2017) ou até mesmo por duas horas (BRUSENTSEV *et al.*, 2018). Curvas de refrigeração rápidas não são rotineiramente empregadas, devido ao comprometimento significativo da inte-

gridade celular e da fertilidade dos espermatozoides pós-descongelção (VIZUETE *et al.*, 2014). A congelção dos espermatozoides, ocorre quando estes são submetidos aos vapores de nitrogênio (-70 °C), sendo que vários protocolos priorizam 20 minutos (BURANAAMNUAY, 2017; BRUSENTSEV *et al.*, 2018), mas também já foram descritos protocolos com 15 minutos (VILLAVARDE *et al.*, 2013), dez minutos (MANEE-IN *et al.*, 2014) e cinco minutos (THUWANUT *et al.*, 2015).

Em relação à descongelção, esta pode ser realizada a 37 ou 38 °C por 30 segundos (MARTINS e JUSTINO, 2015), porém, alguns protocolos adotam a descongelção ultrarrápida a 70 °C por cinco segundos (VIZUETE *et al.*, 2014; CHATDARONG, 2017). A escolha do protocolo de descongelção depende da curva de refrigeração adotada, sendo assim, espermatozoides refrigerados lentamente serão destinados à descongelção lenta, para permitir a completa dissolvição dos cristais de gelo extracelulares, a diluição dos solutos no meio e a reidratação lenta das células (MARTINS e JUSTINO, 2015). Em contrapartida, espermatozoides refrigerados e congelados de forma rápida (4 °C/min) e ultrarrápida (14 °C/min) (PUKAZHENTHI *et al.*, 1999) devem ser descongelados rapidamente, a fim de impedir a recristalização do gelo intracelular e a consequente criação de pequenos cristais que possam causar danos à estrutura celular (MARTINS e JUSTINO, 2015).

Dentre as principais injúrias causadas pela congelção sobre os espermatozoides felinos, destacam-se: o choque osmótico, a formação de cristais intracelulares e o estresse oxidativo (AMIDI *et al.*, 2016; JARA *et al.*, 2019). O choque osmótico ocorre pela entrada e saída de água e solutos da membrana plasmática, fator que altera o volume do espermatozoide, e também contribui para a formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (AMIDI *et al.*, 2016). Já a formação de cristais intracelulares se dá pela exposição dos espermatozoides a baixas temperaturas e leva ao rompimento da membrana plasmática (HOLT, 2000a; BURANAAMNUAY, 2017). O estresse oxidativo, por sua vez, decorre da formação exacerbada de ROS, substância que altera as características da membrana espermática e implica na manutenção de funções fisiológicas do espermatozoide, até impedir sua capacidade de fertilizar o ócito (AITKEN, 2017; JARA *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2019).

Em um recente estudo, Cheuquemán *et al* (2018) compararam a viabilidade de espermatozoides felinos ejaculados, frescos e criopreservados, em diluente a base de TRIS ácido cítrico, e, com isto, constataram a redução de todos os parâmetros cinéticos avaliados pelo sistema CASA após a descongelção. Também, foi observada uma queda significativa da integridade de membrana e atividade mitocondrial, em contrapartida ao aumento na concentração de O₂ para as amostras espermáticas congeladas.

Para células espermáticas de gatos, o glicerol é um grande aliado na crioproteção, pois reduz a temperatura de fusão da água intracelular, aumenta a desidratação a baixas temperaturas e reduz a produção de cristais de gelo (HOLT, 2000b; VILLAVARDE *et al.*, 2013). Com isso, o uso de glicerol na concentração de 5% em diluente à base de TRIS gema apresentou maior motilidade total e progressiva do espermatozoide felino após descongelção quando comparadas a concentrações de 3% e 7% do mesmo crioprotetor (VILLAVARDE *et al.*, 2013). A adição de 2mM de Hidroxitolueno butirado a um meio diluente foi capaz de manter a motilidade e integridade de membrana de espermatozoides felinos pós-descongelção semelhante ao sêmen fresco, após diminuir as concentrações de ânion superóxidos (JARA *et*

al., 2019). Contudo, o uso do inibidor da enzima ROCK como um antioxidante na concentração de 10 μ M, não preveniu a redução da motilidade e integridade de membrana no sêmen de gatos após a descongelação (THARASANIT *et al.*, 2020).

Os espermatozoides recuperados do epidídimo, sofrem os mesmos danos dos espermatozoides ejaculados, porém, são mais susceptíveis às crioinjúrias (HERMANSSON e AXNÉR, 2007). Assim, Barbosa *et al.* (2020) notaram que os espermatozoides epididimários descongelados apresentaram redução estatística para motilidade total, motilidade progressiva e atividade mitocondrial quando diluídos em TRIS. Outro estudo também demonstrou quedas significativas na porcentagem de espermatozoides epididimários vivos e sua motilidade total sob dois diluentes pós-descongelação, mas o glicerol manteve a morfologia de espermatozoides do epidídimo após sua criopreservação, com média de 30% de células normais (BRUSENTSEV *et al.*, 2018).

Thuwanut *et al.* (2010) obtiveram uma boa proteção para células espermáticas do epidídimo submetidas à criopreservação, ao adicionar a enzima antioxidante glutathione peroxidase ao meio diluente à base de TRIS gema. Enquanto Barbosa *et al.* (2020) descreveram que, utilizando o glicerol em concentração final de 5%, o tempo ideal de glicerolinização é de cinco minutos. A submissão da amostra espermática à curva de equilíbrio de 4 °C por uma hora (refrigeração de 1,2 °C/minuto) com a posterior adição do glicerol e estabilização a 4 °C por cinco minutos promoveu a melhor preservação da qualidade espermática quando comparada a com dez minutos, onde observou-se uma acentuada redução de motilidade e vigor. Em grandes felídeos, como: leões (*Pantheraleo*), onças (*Pantheraonca*), leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*), chitas (*Acinonyx jubatus*) e gatos leopardos (*Prionailurus bengalensis*), é descrito 25-50% de motilidade após a descongelação. No entanto, para tigres (*Panthera tigris*), gato do mato grande (*Oncifelis geoffroy*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*), foi descrito 1-20% de motilidade após a descongelação (SILVA *et al.*, 2004).

Ao utilizar sêmen felino recuperado direto do testículo e refrigerado a 4 °C por sete dias em meio diluente suplementado com BSA, Buarpong *et al.* (2015) conseguiram taxas de clivagem de embriões, obtidos por ICSI semelhante ao uso de sêmen fresco. Ademais, o uso do sêmen felino eletroejaculado e criopreservado, na inseminação artificial, tornou-se uma realidade na equipe de Platz *et al.* (1978), que obtiveram 10,6% de taxa de concepção.

Ao utilizarem sêmen após a descongelação associado à inseminação artificial intrauterina, Villaverde *et al.* (2009) atingiram 75% de sucesso de gestação em gatos domésticos. Já em outro estudo, a realização da inseminação artificial intrauterina com espermatozoides recuperados do epidídimo e criopreservados obteve 27,3% de taxa de prenhez em gatas (TSUTSUI *et al.*, 2003). Brusentsev *et al.* (2018), por sua vez, produziram 44% de embriões *in vitro* com espermatozoide epididimário pós-descongelação, taxa estatisticamente semelhante ao sêmen fresco.

Já, o uso do inibidor da enzima ROCK, como um antioxidante, na concentração de 10 μ M, foi capaz de aumentar as taxas de clivagem de embriões felinos produzidos *in vitro* com sêmen criopreservado (THARASANIT *et al.*, 2020). Enquanto Kunkitti *et al.* (2016), ao utilizarem espermatozoides de felinos do corpo e cauda do epidídimo, depararam-se com uma taxa de clivagem de 32% e 33,3%, respectivamente. Entretanto, as taxas de blastocistos foram maiores para espermatozoides recuperados da cauda (14,08%).

De acordo com Tajima *et al.*, (2015) foi obtido, no Japão, um filhote de uma fêmea leopardo-de-amur (*Pionailurus bengalensis eutilura*) por meio da inseminação artificial intrauterina após protocolo hormonal de ovulação com hCG e eCG. Ademais, em 2019, foi noticiado o nascimento, no Brasil, após 104 dias de gestação, do primeiro filhote de onça pintada (*Panthera onca*), resultante da inseminação artificial por videolaparoscopia, utilizando sêmen fresco (MERCURI, 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coleta e análise do sêmen felino já possuem técnicas bem estabelecidas, e são essenciais para o conhecimento da qualidade do espermatozoide do gato doméstico. Entretanto, a preservação do sêmen felino ainda encara muitos desafios, por se confrontar com resultados inconstantes acerca da viabilidade espermática pós-descongelamento. Embora a inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões felinos sejam uma possibilidade, até mesmo com o uso de espermatozoides epididimários criopreservados, são necessárias novas pesquisas para o desenvolvimento de diluentes e protocolos de conservação espermática que proporcionem resultados mais consistentes.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, C.L.; SOUZA, N.R.; TREVISOL, E.; VOLPATO, E.; LOPES, M.D. Avaliação da associação de tiletamina, zolazepam, tramadol e isoflurano na coleta de sêmen de gatos domésticos por eletro-ejaculação. In: XX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Anais, p.91, 2013.
- AITKEN, R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*, v.84, n.10, p.1039–1052, 2017.
- AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, v.81, n.1, p.5-17, 2014.
- AMIDI, F.; PAZHOHAN, A.; SHABANI NASHTAEI, M.; KHODARAHMIAN, M.; NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Banking*, v.17, n.4, p.745–756, 2016.
- ANGRIMANI, D.S.R.; LÚCIO, C.F.; VEIGA, G.A.L.; REGAZZI, F.M.; SILVA, L.C.G.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C.I. Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.37, n.4, p.323–327, 2013.
- AXNÉR, E.; FORSBERG, C.L. Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation with Fertility: A Retrospective Study. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, n.3, p.282-291, 2007.
- BARBAS, J.P.; LEAHY, T.; HORTA, A.E.; GARCÍA-HERREROS, M. Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology*, v.82, n.2, p.137–147, 2018.
- Recebido: nov./2021.
Publicado: jun./2022.

BARBOSA, B.S; RODRIGUES SILVA, H.V.R.; TABOSA, B.E.A; NUNES, T.G.P.; MAGALHÃES, F.F.; SILVA, L.D.M. Morphological and morphometric characterization of domestic cat epididymal sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, v.54, n.12, p.1630–1636, 2019.

BARBOSA, B.S; SILVA, H.V.R.; SILVA, T.F.P.; SILVA, L.D.M. Influence of glycerol addition on the quality of cat epididymal sperm during the freeze-thaw process. *Semina: Ciências Agrárias*, v.41, n.4, p.1237–1246, 2020.

BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, n.3, p.125–132, 2010.

BERGSTEIN-GALAN, T.G.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; BICUDO, S.D. Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered from ovine epididymides up to 48 h after death. *Animal Reproduction Science*, v.187, n.4, p.20–27, 2017.

BRUSENTSEV, E.; KIZILOVA, E.; MOKROUSOVA, V.; KOZHEVNIKOVA, V.; ROZHKOVA, I.; AMSTISLAVSKY, S. Characteristics and fertility of domestic cat epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media. *Theriogenology*, v.110, n.4, p.148–152, 2018.

BUARPUNG, S.; THARASANIT, T.; THONGKITTIDILOK, C.; COMIZZOLI, P.; TECHAKUMPHU, M. Spermatozoa isolated from cat testes retain their structural integrity as well as a developmental potential after refrigeration for up to 7 days. *Zygote*, v.23, n.5, p.644–651, 2015.

BURANAAMNUAY, K. Protocols for sperm cryopreservation in the domestic cat: A review. *Animal Reproduction Science*, v.183, n.11, p.56–65, 2017.

CARDOSO, J.F.S.; PAULA, N.R.O.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP[®]-106 e resfriado a 4 °C. *Comunicata Scientiae*, v.1, n.2, p.146–152, 2010.

CHATDARONG, K. Retained fertilizing capability in cryopreserved feline spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.52, n.4, p.261–264, 2017.

CHEUQUEMÁN, C.; FAÚNDEZ, R.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J. Changes in sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa. *Andrologia*, v.50, n.9, p.1–8, 2018.

CUNTO, M.; KUSTER, D.G.; BINI, C.; CARTOLANO, C.; PIETRA, M.; ZAMBELLI, D. Influence of Different Protocols of Urethral Catheterization after Pharmacological Induction (Ur.Ca.P.I.) on Semen Quality in the Domestic Cat. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, n.6, p.999–1002, 2015.

DE PAZ, P.; MATA-CAMPUZANO, M.; TIZADO, E.J.; ÁLVAREZ, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. *Theriogenology*, v.76, n.7, p.1313–1325, 2011.

Recebido: nov./2021.

Publicado: jun./2022.

FERRAZ, M.A.M.M.; MORATÓ, R.; YESTE, M.; ARCARONS, N.; PENA, A.I.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O.; MUIÑO, R.; MOGAS, T. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*, v.81, n.8, p.1067–1072, 2014.

FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M.M.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRÓ, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology*, v.70, n.6, p.936–945, 2008.

GALLEGO, V.; CAVALCANTE, S.S.; FUJIMOTO, R.Y.; CARNEIRO, P.C.F.; AZEVEDO, H.C.; MARIA, A.N. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology*, v.87, n.1, p.16–24, 2017.

GUTIÉRREZ-REINOSO, M.; GARCÍA-HERREROS, M. Normozoospermic versus teratozoospermic domestic cats: Differential testicular volume, sperm morphometry, and subpopulation structure during epididymal maturation. *Asian Journal of Andrology*, v.18, n.6, p.871–878, 2016.

HERMANSSON, U.; AXNÉR, E. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 °C. *Theriogenology*, v.67, n.7, p.1239–1248, 2007.

HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology*, v.66, n.4, p.996–1003, 2006.

HIDALGO, M.M.T.; ALMEIDA, A.B.M.; MORAES, F.L.Z.; MARUBAYASHI, R.Y.P.; SOUZA, F.F.; BARREIROS, T.R.R.; MARTINS, M.I.M. Sperm subpopulations influence the pregnancy rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, v.56, n.8, p.1117-1127, 2021.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, n.1, p.47–58, 2000a.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, n.1/3, p.3–22, 2000b.

HOLT, W.V.; LOOK, K.J.W.V. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, v.127, n.5, p.527–535, 2004.

HOWARD, J.G.; PURSEL, V.G.; WILDT, D.E.; BUSH, M. Comparison of various extenders for freeze-preservation of semen from selected captive wild ungulates. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.179, n.11, p.1157–61, 1981.

HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Teratospermic and Normospermic Domestic Cats: Ejaculate Traits, Pituitary Gonadal Hormones, and Improvement of Spermatozoal Motility and Morphology After Swim-Up Processing. *Journal of Andrology*, v.11, n.3, p.204–15, 1990.

HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M.E. *Zoo and*

Recebido: nov./2021.

Publicado: jun./2022.

Wild Animal Medicine: Current Therapy. 3^a ed., Philadelphia, PA: W.B. Saunders, p.390–399, 1993.

JARA, B.; MERINO, O.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J. Positive effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the quality of cryopreserved cat spermatozoa. *Cryobiology*, v.89, n.4, p.76–81, 2019.

JIMÉNEZ, E.; PÉREZ-MARÍN, C.C.; VIZUETE, G.; MILLÁN, Y.; AGÜERA, E. 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.

JOHNSON, A K. Assisted Reproduction in the Male Cat. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v.48, n.4, p.511–521, 2018.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KADIRVEL, G. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, n.1, p.165–172, 2011.

KUMAR, A.; PRASAD, J.K.; SRIVASTAVA, N.; GHOSH, S.K. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages during Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, v.17, n.6, p.603–612, 2019.

KUNKITTI, P.; AXNÉR, E.; BERGQVIST, A.S.; SJUNNESSON, Y. In vitro fertilization using frozen-thawed feline epididymal spermatozoa from corpus and cauda regions. *Theriogenology*, v.86, n.6, p.1403–1408, 2016.

LIMA, D.V.C.; SILVA, L.D.M. Obtenção e conservação do material genético do gato doméstico macho. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.41, n.1, p.278–282, 2017.

LUVONI, G.C.; MORSELLI, M.G. Canine epididymal spermatozoa : A hidden treasure with great potential, *Reproduction in Domestic Animals*, v.52, n.4, p.197–201, 2017.

MANEE-IN, S.; PARMORNSUPORNVICHIT, S.; KRAIPRAYOON, S.; THARASANIT, T.; CHANAPIWAT, P.; KAEOKET, K. L-carnitine supplemented extender improves cryopreserved-thawed cat epididymal sperm motility. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v.27, n.6, p.791–796, 2014.

MAROTO-MORALES, A.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; RAMÓN, M.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J. Current status and potential of morphometric sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, v.18, n.6, p.863-870, 2016.

MARTINS, M.I.M.; JUSTINO, R.C. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.39, n.1, p.136–140, 2015.

MARTINS, M.I.M.; LEVY, X.; NULDEMAN, N.; ROUTIER, J.Y.; ELBAZ, J.M.; FONTBONNE, A. New stimulation protocol of electroejaculation for semen collection in cheetahs. In: XIX European Veterinary Society Small Animal Reproduction Congress (EVSSAR), p.11, 2016.

Recebido: nov./2021.

Publicado: jun./2022.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, A.K.; TRAUTWEIN, L.G.C. Subpopulações Esperáticas. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.41, n.1, p.243–247, 2017.

MERCURI, I. Trabalho da UFMT resulta no primeiro filhote de onça-pintada do mundo nascido de inseminação artificial. Disponível em: <<https://www.gcnoticias.com.br/geral/trabalho-da-ufmt-resulta-no-primeiro-filhote-de-onca-pintada-do-mundo-nascido-de-inseminacao-artificial/67384248>>. Acesso em: 02 mai 2022.

MORAIS, R.N.; MUCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L.H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J.L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. weidii*) and tigrina (*L. tigrinus*). Theriogenology, v.57, n.8, p.2027-2041, 2002.

MORATO, R.G.; MOURA, C.A.; CRAWSHAW JR., P.G. Inmobilización química de jaguares libres con una combinación de tiletamina y zolazepam. In: MEDELLIN, R.A.; CHETKIEWICZ, C.; RABINOWITZ, A.; REDFORD, K.H.; ROBINSON, J.G.; SANDERSON, E.; TABER, A. El Jaguar en el nuevo milenio. Una evaluación de su estado, detección de prioridades y recomendaciones para la conservación de los jaguares en América. México. 1ª ed., Universidad Nacional Autónoma de México/Wildlife Conservation Society, 2002, p.63.

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

MUIÑO, R.; RIVERA, M.M.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J.E.; PEÑA, A.I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. Animal Reproduction Science, v.109, n.1/4, p.50–64, 2008.

MUIÑO, R.; PEÑA, A.I.; RODRÍGUEZ, A.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. Theriogenology, v.72, n.6, p.860–868, 2009.

NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORAN, J.M.; PEÑA, F.J. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: Changes after cryopreservation. Reproduction in Domestic Animals, v.41, n.5, p.408–415, 2006.

PAZ, R.C.R.; ZUGUE, R.M.; BARNABE, V.H.; MORATO, R.G.; FELIPPE, PAN.; BARNABE, R.C. Capacidade de penetração de semen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em óocitos heterólogos. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.37, n.6, p.462-466, 2000.

PAZ, R.C.R. Novas tecnologias para colheita de sêmen de felídeos domésticos e selvagens. In: IV Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), p.55-65, 2019.

PEÑA, A.I.; BARRIO, M.; BECERRA, J.J.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Motile sperm subpopulations in frozen-thawed dog semen: Changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. Animal Reproduction Science, v.133, n.3/4, p.214–223, 2012.

PENFOLD, L.M.; JOST, L.; EVENSON, D.P.; WILDT, D.E. Normospermic Versus
Recebido: nov./2021.
Publicado: jun./2022.

Teratospermic Domestic Cat Sperm Chromatin Integrity Evaluated by Flow Cytometry and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Biology of Reproduction*, v.69, n.5, p.1730–1735, 2003.

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

PROCHOWSKA, S.; NIZAŃSKI, W. In vitro fertilizing potential of urethral and epididymal spermatozoa collected from domestic cats (*Felis catus*). *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v.20, n.1, p.19–24, 2017.

PUKAZHENTHI, B.; PELICAN, K.; WILDT, D.; HOWARD, J.G. Sensitivity of domestic cat (*FelisCatus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold induced acrosomal damage. *Biology of Reproduction*, v.61, n.1, p.135-141, 1999.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, v.59, n.9, p.1973–1990, 2003.

RAHEJA, N.; CHOUDHARY, S.; GREWAL, S.; SHARMA, N.; KUMAR, N. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v.6, n.3, p.239–245, 2018.

RAMÓN, M.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; JIMÉNEZ-RABADÁN, P. MILAGROS, C.E.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ANEL-LÓPEZ, L.; SOLER, A.J.; FERNANDÉZ-SANTOS, M.R.; GARDE, J.J. Sperm cell population dynamics in ram semen during the cryopreservation process. *PloSone*, v.8, n.3, e59189, 2013.

SAMPAIO, B.F.B.; ZÚCCARI, C.E.S.N.; SAMPAIO, B.F.B.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Adição de antioxidantes hidro e lipossolúveis ao diluidor de refrigeração do sêmen equino–revisão de literatura. *Revista Eletrônica de Veterinária*, v.17, n.11, p.1–28, 2016.

SANTOLARIA, P.; VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; FANTOVA, E.; BLASCO, M.E.; SILVESTRE, M.A.; YÁNIZ, J.L. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*, v.163, n.1, p.82–88, 2015.

SILVA, A.R.; MORATO, R.G.; SILVA, L.D.M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Animal Reproduction Science*, v.81, n.1/2, p.159-175, 2004.

SILVA, T.F.P.; DIAS, C.G.A.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; BRAGA, A.C.P.; SILVA, L.D.M. Avaliação de segurança e analgesia de protocolos anestésicos para eletroejaculação em gatos domésticos (*Felis catus*). *Ciência Animal Brasileira*, v.12, n.3, p.497–505, 2011.

SOUZA, A.K.; TRAUTWEIN, L.G.C.; PARANZINI, C.S.; PERENCIN, F.M.; CARDOSO, G.S.; MARTINS, M.I.M. Influence of cooling temperature in sperm subpopulations of domestic cats. *Animal Reproduction Science*, v.189, n.2, p.1–10, 2018.

TAJIMA, H.; YOSHIKAWA, M.; SASAKI, S.; YAMAMOTO, F.; NARUSHIMA, E.; TSUTSUI, T. Intrauterine insemination with fresh semen in Amur leopard cat (*Prionailurus bengalensis eutilura*) during non-breeding season. *Journal Veterinary Medical Science*, v.79, n.1, p.92-99, 2017.

TEBET, J.M.; MARTINS, M.I.M.; CHIRINEA, V.H.; SOUZA, F.F.; CAMPAGNOL, D.; LOPES, M.D. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa, *Theriogenology*, v.66, n.6/7, p.1629-1632, 2006.

THARASANIT, T.; TIPTANAVATTANA, N.; ORAVETDILOK, K.; TUANGSINTANAKUL, T.; SIRITHANYAKUL, P.; TANVETTHAYANONT, P. Optimal concentration of Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) inhibitor improved sperm membrane functionality and fertilizing ability of cryopreserved-thawed feline sperm. *Theriogenology*, v.144, n.1, p.27-32, 2020.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; JOHANNISSON, A.; BERGQVIST, A.S.; SÖDERQUIST, L.; AXNÉR, E. Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of in vitro antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. *Theriogenology*, v.73, n.8, p.1076-1087, 2010.

THUWANUT, P.; ARYA, N.; COMIZZOLI, P.; CHATDARONG, K. Effect of extracellular adenosine 5'-triphosphate on cryopreserved epididymal cat sperm intracellular ATP concentration, sperm quality, and in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, v.84, n.5, p.702-709, 2015.

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

VÁZQUEZ, A.J.F.; CEDILLO, M.J.; QUEZADA, V.J.; RIVAS, A.C.; MORALES, E.C.L.; AYALA, E.M.E.; HERNÁNDEZ, M.J.; GONZÁLEZ, R.A.; ARAGÓN, M.A. Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. *Animal Reproduction Science*, v.154, n.3, p.29-38, 2015.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.149-179, 2002.

VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J.L. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Animal Reproduction Science*, v.139, n.1/4, p.182-189, 2013.

VILLAVERDE, A.I.S.B.; MELO, C.M.; CORRENTE, J.E.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D. Comparação Entre dois Métodos de coloração para análise morfológica e acrossomal de espermatozoides de gato doméstico (*Felis Catus*). *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.3, p.686-692, 2008.

VILLAVERDE, A.I.S.B.; FIORATTI, E.G.; PENITENTI, M.; IKOMA, M.R.V.; TSUNEMI, M.H.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on

domestic cat spermatozoa. *Theriogenology*, v.80, n.7, p.730–737, 2013.

VILLAVERDE-MORCILLO, S.; ESTESO, M.C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO DÍAZ, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; CAMPO, J.L.; SANTIAGO-MORENO, J. Influence of Staining Method on the Values of Avian Sperm Head Morphometric Variables. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, n.5, p.750–755, 2015.

VIZUETE, G.; JIMÉNEZ, E.; AGÜERA, E.I.; PÉREZ-MARÍN, C.C. Impact of ultra-rapid freezing on the motility, morphology, viability and acrosome integrity of epididymal cat sperm diluted in sucrose-based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, v.49, n.1, p.5–8, 2014.

WILDT, D.E.; BUSH, M.; HOWARD, J.G.; O'BRIEN, S.J.; MELTZER, D.; VAN DYK, A.; EBEDDES, H.; BRAND, D.J. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, v.29, n.4, p.1019–25, 1983.

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M.; PRATI, F.; MERLO, B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology*, v.68, n.5, p.796–803, 2007.

ZAMBELLI, D.; PRATI, F.; CUNTO, M.; IACONO, E.; MERLO, B. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.69, n.4, p.485–490, 2008.