

REBECA MARQUES MASCARENHAS

**AVALIAÇÃO INDIVIDUAL E RACIAL DA QUALIDADE DO SÊMEN CANINO
“IN NATURA” E CRIOPRESERVADO EM DIFERENTES PROTOCOLOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*


**VIÇOSA
BRASIL - MINAS GERAIS
2008**

REBECA MARQUES MASCARENHAS

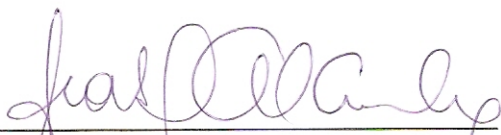
**AVALIAÇÃO INDIVIDUAL E RACIAL DA QUALIDADE DO SÊMEN CANINO
"IN NATURA" E CRIOPRESERVADO EM DIFERENTES PROTOCOLOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 08 de fevereiro de 2008.



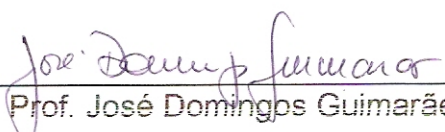
Prof. Deiler Sampaio Costa



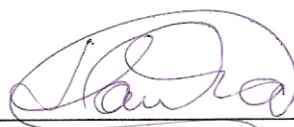
Profa. Isabel Candia N. da Cunha



Prof. Guilherme Ribeiro Valle



Prof. José Domingos Guimarães



Prof. Tarcízio Antônio Régio de Paula
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Tarcízio e Regina, pelo apoio incondicional durante toda a jornada, e por terem sido sempre exemplos do mais profundo amor, respeito e admiração pelos animais, vocês são minha fonte de inspiração.

A minha mãe pela ajuda inestimável na correção ortográfica e das bibliografias.

Ao meu irmão Tarcízio pelo amor e amizade, resistentes aos piores humores.

A minha avó Marta pela torcida e pelas inúmeras hospedagens.

Ao Leo pelos anos passados juntos e pelos que virão.

Ao amigo Moacir, pela amizade de anos.

A Abigail, Teobaldo, Jujú e Mustache por todo dia me lembrarem por que escolhi me tornar veterinária.

Ao meu orientador, Prof. Tarcízio, pela oportunidade e orientação, e por me mostrar que o primeiro requisito de um bom profissional é a paixão pelo ofício, foi um prazer e uma honra trabalhar com você.

Aos professores Eduardo Paulino e José Domingos pelos ensinamentos, sugestões e conversas.

Aos professores Cláudio Fonseca e Sérgio da Mata pelo incentivo.

Ao professor e amigo Marco Túlio por ter se tornado parte da família.

Ao amigo Luciano Parzannini, pelo companheirismo.

Aos colegas de mestrado, Bianca, Bruna, Carlão, Eduardo, João Bosco, Juliano, Maytê, Marcos e Tyara pelos trabalhos realizados juntos e por me ensinarem, cada uma à sua maneira, valiosas lições sobre a natureza humana.

A Rose, anjo da guarda de todos nos pós-graduandos.

Aos amigos Daniel, Clarisse, Lucas, Mariana, Caio e César, pela inestimável ajuda.

À Beth e Marcio Faria do canil Airaf, pelo apoio e entusiasmo.

À Beth Faria do canil Black Devils pelos anos de amizade.

À Elissa e Wiliam do canil Contreau pelo apoio desde o início.

À Daniel e Silvia Bellof do canil Doble'D Dobes por nos permitir trabalhar com seus cães.

À Rodrigo, Junior, João, Bob, Mel, Lili, Bolinha, Princesa, Jivago, Ari, Rodin, Zoe, Toro, Manha, Gedey, Missi, Lico, Caju e Clif por tornarem possível este trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade.

BIOGRAFIA

Rebeca Marques Mascarenhas, filha de Tarcízio Antônio Rego de Paula e Maria Regina Marques Tiburcio nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, no dia 19 de maio de 1982.

No ano de 2001 ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa concluindo o curso no ano de 2005.

Em maio de 2006 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, na área Morfologia da Reprodução.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1-INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1-Origem do cão e sua seleção genética.....	3
2.2-A criopreservação do sêmen e seus aspectos danosos ao espermatozóide.....	4
2.3-Os parâmetros de avaliação do sêmen e suas correlações entre si e com a fertilidade.....	9
2.4-Referências Bibliográficas.....	11
3-PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO SÊMEN FRESCO E EFEITO DA CENTIFUGAÇÃO SOBRE A MOTILIDADE E INTEGRIDADE DE MEMBRANA ESPERMÁTICA DE CÃES DAS RAÇAS BEAGLE, SCHNAUZER, DOBERMAN E BOXER.....	20
Resumo.....	20
Abstract.....	21
3.1-Introdução.....	22
3.2-Materiais e Métodos.....	23
3.3-Resultados e Discussão.....	25
3.4-Conclusão.....	28
3.5-Referências Bibliográficas.....	29
4 - EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE RESFRIAMENTO, CURVAS DE CONGELAMENTO E CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL NA QUALIDADE DO SÊMEN CANINO DESCONGELADO.....	33
Resumo.....	33
Abstract.....	35
4.1-Introdução.....	36
4.2-Materiais e Métodos.....	38

4.3-Resultados e Discussão.....	41
4.4-Conclusão.....	46
4.5-Referências Bibliográficas.....	46
5 - INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO INDIVIDUAL E RACIAL NA QUALIDADE DO SÊMEN CANINO CONGELADO EM MEIO TRIS- CITRATO ACRESCIDO DE 6 % DE GLICEROL.....	51
Resumo.....	51
Abstract.....	52
5.1-Introdução.....	53
5.2-Materiais e Métodos.....	55
5.3-Resultados e Discussão	57
5.4-Conclusão.....	64
5.5-Referências Bibliográficas.....	65
6-CONCLUSÕES GERAIS	71
ANEXO 1.....	72

RESUMO

MASCARENHAS, Rebeca Marques, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Avaliação individual e racial da qualidade do sêmen canino “*in natura*” e criopreservado com diferentes protocolos.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co-orientadores: Eduardo Paulino da Costa e Sérgio Luiz Pinto da Matta.

O presente trabalho busca descrever a análise *in vitro* do sêmen fresco e as diferenças individuais e raciais na congelabilidade do sêmen de cães das raças Beagle, Schnauzer, Doberman e Boxer. Foi também avaliado o efeito da centrifugação, do tempo de equilíbrio, da taxa de congelamento e de diferentes concentrações de glicerol, sobre a qualidade o sêmen canino criopreservado em meio diluidor a base de Tris-Citrato. Foram ainda analisadas as correlação dos parâmetros de avaliação *in vitro* do sêmen antes e depois o congelamento. Para tanto, foram utilizados 12 cães das raças Beagle (n=3), Schnauzer (n=3), Doberman (n=3) e Boxer (n=3), sendo 3 ejaculados coletados por indivíduo, totalizando 36 ejaculados. Após a coleta o sêmen foi centrifugado, ressuspendido em meio Tris-Citrato contendo 1, 2, 4 e 6% de glicerol e evasado em palhetas de 0,25mL. Após o envase o sêmen foi resfriado por 1 hora a 4^oC e em seguida metade das palhetas de cada tratamento foi encaminhada para o congelamento e o restante foi mantido por mais 1 hora em equilíbrio a 4^oC, antes do congelamento. Duas taxas de congelamento foram testadas em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido através do posicionamento das palhetas a 5 e 10 cm da superfície do nitrogênio por 10 minutos. O descongelamento foi realizado através de imersão em água a 38^oC por 1 minuto. O sêmen foi avaliado no momento da coleta, após a centrifugação e ao descongelamento quanto à movimentação dos espermatozóides através de vigor, motilidade e índice espermático e quanto à integridade e viabilidade da membrana plasmática pelos testes hiposmótico e de coloração supravital. A longevidade espermática foi estimada no sêmen descongelado através do teste de termorresistência (TTR). No presente trabalho as médias individuais de vigor e motilidade espermáticos no sêmen fresco variaram de 3,5 a 5,0 e de 63 a 90% respectivamente enquanto as médias raciais variaram de 4,4 a 4,9 e de 80 a 90% respectivamente. A centrifugação do sêmen resultou em queda de cerca de 13% no vigor espermático, 14% na motilidade e no índice espermático. A análise dos parâmetros de viabilidade e integridade de membrana plasmática no sêmen após centrifugação mostra diminuição de 38% e 14% nas células reativas ao teste

hiposmótico e de coloração supravital respectivamente. Os resultados dos testes hiposmótico, de coloração supravital e de termorresistência no sêmen descongelado demonstram de maneira geral melhor desempenho dos protocolos de congelamento com a presença do tempo de equilíbrio. Não foi observada influência da taxa de congelamento de forma isolada sobre os parâmetros seminais avaliados. Variações significativas só foram observadas quando se associou à variação da taxa de congelamento, variações no tempo de equilíbrio e concentração de glicerol. Isoladamente, o aumento no percentual de glicerol de 1 para 6% na composição do meio diluidor, promove melhoria pontual na integridade da membrana citoplasmática e no índice espermático ao descongelamento. Porém, quando se associa os resultados observados dos maiores níveis de glicerol à presença do tempo de equilíbrio e à taxa lenta de congelamento, aumentos significativos são observados em todos os parâmetros estudados. Variação individual foi observada no índice espermático no sêmen descongelado, mas não no sêmen fresco. Já os parâmetros de integridade e viabilidade da membrana plasmática apresentaram variação individual em ambos. Quando se avalia a variável raça não se observa alterações significativas quanto aos parâmetros avaliados no sêmen fresco, porém no sêmen descongelado, observaram-se variações significativas na integridade e viabilidade da membrana plasmática. Os cães da raça Schnauzer apresentaram significativamente menor longevidade espermática após o descongelamento. As raças Doberman e Boxer apresentaram os melhores resultados de congelabilidade na avaliação *in vitro*. A exceção do teste de coloração supravital, os parâmetros estudados apresentaram correlações significativas entre os dados coletados no sêmen fresco com aqueles observados no sêmen descongelado.

ABSTRACT

MASCARENHAS, Rebeca Marques, Universidade Federal de Viçosa, February of 2008. **Individual and breed evaluation of the quality of canine semen “*in natura*” and cryopreserved with different protocols.** Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co-Advisers: Eduardo Paulino da Costa and Sérgio Luiz Pinto da Matta

Although the first birth of pups with use of frozen semen has been reported almost 40 years ago, still today the conception rate with thawed canine semen is generally inferior to the observed in other species. Many factors influencing the semen quality through the cryopreservation process are known, including the centrifugation protocol, the extender composition, the association between the cryoprotectors, the cooling rate, the time of equilibrium and the freezing rate, as well as the association between thawing and freezing rates. Individual variations in the semen freezability are found in many species, including the dog. Some authors attribute these variations to the differences in the spermatid membrane lipid composition and spermatozoon sensitivity of the glycerol toxic effects. In present work 36 semen samples were collected, from 12 dog of the: Beagle, Schnauzer, Doberman and Boxer breeds, by digital manipulation. After the collection the semen was centrifuged, reextended in Tris-Citrato extender added with 1, 2, 4 and 6% of glycerol and packaged in 0,25mL straws. After that the semen were cooled for 1 hour until 4°C, then half of the straws of each treatment was immediately frozen and the remain was kept by more 1 hour in equilibrium at 4°C before the freezing. Two freezing rates had been tested in termical box contend liquid nitrogen through the positioning of the straws 5 and 10 cm above the surface of nitrogen per 10 minutes. The thawing was carried through immersion in water 38°C per 1 minute. The semen was evaluated at the moment of the collection, after the centrifugation and immediately after thawing for spermatozoa movement through motility, progressive status, and sperm index and for plasma membrane integrity and viability through hiposmotic swelling tests and live/dead stain. The sperm longevity was evaluated through the thermoresistecce test. In the present work the individual averages of sperm motility and progressive status in the fresh semen had varied from 3.5 to 5.0 and 63 to 90% respectively, while the breed averages had varied of 4.4 the 4.9 and 80 to 90% respectively. The semen centrifugation resulted in significant fall of 13% in progressive status and 14% in the motility and spermatid index. The analysis of the

parameters of plasma membrane viability and integrity in the semen after centrifugation shows significant reduction of 38% and 14% in the reactive cells to the hiposmotic swelling test and to the supravital coloration respectively. The results of the hiposmotic swelling test, live/dead stain and thermoresistance in the thawed semen demonstrate better performance when protocols of freezing were used with equilibrium time. Influence of the freezing rate, in isolated form, was not observed on the seminal parameters evaluated and significant variations had been only observed when equilibrium time and glycerol concentration were associated. Isolate the increase in the percentage of glycerol from 1 to 6% in the extender composition, promotes prompt improvement to plasma membrane integrity and to spermatic index in the thawed samples. However, when associates the observed results of biggest levels of glycerol to the presence of equilibrium time and to the slow rate of freezing, significant increases are observed in all the studied parameters. Individual variation was observed in spermatic index of thawed semen, but not in the fresh semen. Already the parameters of plasma membrane integrity and viability had presented individual variation in both. When the parameter breeds is evaluated, any significant alterations were observed on the evaluated parameters in fresh semen, however in the thawed semen, significant variations in the plasma membrane integrity and viability had been observed. The dogs of the Schnauzer breed had presented significantly shorter sperm longevity after the thawing. The Doberman and Boxer breeds had presented the best results of freezability in *in vitro* evaluation. With the exception of the test of live/dead stain, the studied parameters had presented significant correlations between the data collected in fresh semen with those observed in thawed semen.

1-INTRODUÇÃO GERAL

A população de animais de estimação, em especial os cães, vem crescendo em número e importância afetiva em todo o mundo, um fenômeno provavelmente vinculado à progressiva urbanização de nossa sociedade. O Brasil é o segundo país do mundo em população de animais de estimação ficando atrás apenas dos EUA (Anfal Pet, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde a população de cães nos países emergentes gira em torno de 10 a 16,7% da população humana (Reichmann et al, 1999). Desta forma, com base na projeção populacional divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no censo de 2007 (IBGE, 2007), pode-se estimar a população atual de cães no Brasil em cerca de 20 a 30 milhões de animais. Estima-se ainda que o gasto médio per capto com produtos e serviços veterinários voltados para animais de estimação seja de R\$ 390,00/ano (Anfal Pet, 2007). Em 2006, o setor de produtos para animais de companhia movimentou mais de US\$ 2 bilhões e a projeção de faturamento para 2007 é de US\$ 3,3 bilhões. Este setor é ainda responsável por mais de 12.000 empregos diretos apenas na área industrial (Anfal Pet, 2007).

O crescente interesse na criação de animais de estimação, vem se refletindo particularmente na cinofilia especializada, onde se observa nas últimas décadas aumento do investimento na melhoria zootécnica dos animais, através de programas de melhoramento genético e principalmente da importação de reprodutores. Em seu último relatório anual Confederação Brasileira de Kennels Clubs (CBKC) informa a importação de 483 matrizes e reprodutores, além de 98.120 novos registros de em 138 diferentes raças caninas (CBKC, 2005). O crescente investimento na melhoria zootécnica dos animais cria nos dias atuais uma grande demanda por biotecnologias de reprodução assistida que potencializem o aproveitamento de reprodutores de qualidade superior (Peña et al., 2006). As tecnologias de criopreservação de sêmen, em particular o congelamento de sêmen, têm despertado especial interesse entre criadores de cães, uma vez que permitem o armazenamento de material genético, por período de tempo indeterminado (Wilson, 1993) e facilitam a troca do material genético, dispensando a movimentação dos animais e reduzindo o risco potencial de transmissão de doenças (Linde-Forsberg, 1995; Silva et al., 1996).

Apesar do crescente interesse em reprodução assistida na espécie canina poucos são os trabalhos publicados anualmente na área de criopreservação de sêmen (Nizanski, 2006; Thomassen et al., 2006). Isso se deve em parte ao alto custo de manutenção de grandes

colônias experimentais e também ao fato de que as agências comerciais de congelamento de sêmen na maioria das vezes não divulgam de forma confiável seus resultados ou metodologias (Linde-Forsberg, 2001). Os dados apresentados na literatura tornam-se especialmente escassos se considerarmos que, a grande variedade de metodologias empregadas pelas diferentes equipes de pesquisadores dificulta a comparação de resultados entre trabalhos (Eilts, 2005). Ainda, em alguns trabalhos, o pequeno número de animais utilizados associado à grande variação de raças torna os resultados apresentados pouco significativos (Linde-Forsberg, 2001; Eilts, 2005). Desta forma até o momento não foi possível determinar um protocolo padrão para congelamento de sêmen na espécie canina devido à insuficiência de dados que esclareçam questões tão básicas como os mais adequados: meio diluidor, crioprotetor, taxas de congelamento e descongelamento e forma de envasamento (Eilts, 2005).

O desenvolvimento de biotecnologias de reprodução assistida em cães desperta ainda crescente interesse entre pesquisadores e estudiosos da vida selvagem, uma vez que este pode ser um valioso modelo para desenvolvimento de tecnologias posteriormente aplicáveis no campo de manejo e conservação de espécies de carnívoros selvagens (Gobello e Corrada, 2003; Luvoni et al., 2006). Segundo a The World Conservation Union (IUCN) 6 espécies de carnívoros selvagens já foram extintos no último século e cerca de 280 espécies sofrem algum grau de ameaça de extinção em todo o mundo (IUCN, 2007), sendo 10 destas espécies pertencem à fauna nativa brasileira (IBAMA, 2007).

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Origem do cão e sua seleção genética

Análises evolutivas baseadas na comparação do DNA mitocondrial sugerem que o cão divergiu do lobo (*Canis lupus*) a mais de 15.000 anos (Schelleng et al, 2005). Desde então uma intensa seleção, especialmente nos últimos 300 anos resultou na criação de mais de 400 raças, sendo o cão a espécie doméstica que apresenta maior variabilidade morfológica (Schelleng et al, 2005; Mascarenhas et al, 2006). As raças caninas foram em sua maioria desenvolvidas a partir de seleção genética extremamente endogâmica, em função exclusivamente de parâmetros estético, habilidade de trabalho e comportamento (Leppänen et al, 2000). Leroy et al., (2006) estudaram, através da análise dos dados de pedigree, a variabilidade genética de populações de indivíduos de nove raças caninas nascidos entre 1997 e 2001 e demonstraram que a variabilidade genética destas populações tem diminuído marcadamente nos últimos anos, sendo que em algumas raças, a taxa de diminuição chega a comprometer a manutenção futura da população. O coeficiente médio de consangüinidade em todas as raças estudadas por Leroy et al (2006) foi próximo a 3,125 %, valor correspondente ao cruzamento de animais com pelo menos um avô em comum. Na maioria das raças estudadas por Leroy et al, (2006), foi observada uma grande proporção de indivíduos apresentando coeficiente de consangüinidade superior a 6,25%, correspondente ao acasalamento de animais com pelo menos dois avôs em comum.

Como conseqüência dos altos níveis de consangüinidade, atualmente muitas raças caninas tem de lidar com doenças geneticamente herdadas, sendo mais de 400 destas doenças já descritas (Patterson, 1993). Patologias caninas, como a displasia coxofemoral, tornando-se ao longo do tempo características em raças como o Retriever do Labrador , o São Bernardo e o Rottweiler. Leppänen et al. (2000) estudando a herdabilidade da displasia coxofemoral afirmaram que, embora esta patologia apresente herdabilidade média, o tipo de seleção genética utilizada entre criadores de cães, baseada unicamente em parâmetros morfológicos, tem dificultado o controle da doença, uma vez que possibilita o acasalamento de animais com boas características fenotípicas mas pobre genótipo. Da mesma forma, esta seleção

genética tem possibilitado o extensivo cruzamento de animais com baixo potencial genotípico em relação a características reprodutivas. Altas incidências de deficiência reprodutivas geneticamente herdadas como cistos ovarianos, baixa habilidade materna e criptorquidismo são particularmente observadas em algumas raças e famílias de cães. Esta seleção arbitrária de características reprodutivas tem sido possível em parte devido ao fato de que, na maioria das criações de cães, utiliza-se sistema de monta natural, onde os reprodutores são pouco exigidos, uma vez que a proporção macho : fêmea é baixa e permite diversos cruzamentos a cada ciclo estral (Rijsselaere et al., 2005). Um dos grandes problemas enfrentados atualmente pelos profissionais que trabalham com reprodução na espécie canina é o fato de que, com o crescente desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida, em especial a criopreservação de sêmen, muitos cães até então considerados bons reprodutores em sistema de monta natural passam a não se adequar. No entanto, algumas vezes, o valor comercial associado a certos animais bem como sua importância como reprodutor em relação ao melhoramento da raça, tornam impraticável a exclusão destes animais dos programas de reprodução.

2.2-A criopreservação do sêmen e seus aspectos danosos ao espermatozoide

Dentre as metodologias de criopreservação, o resfriamento do sêmen canino há muito vem sendo utilizada, já em 1956 Harrop descreve sucesso em uma série de trabalhos conduzidos com sêmen diluído e resfriado a 4° C. A principal justificativa para o resfriamento do sêmen seria a comodidade no seu transporte em relação à movimentação dos animais (Verstegen et al., 2005). Atualmente é possível a conservação da motilidade de espermatozoides caninos por períodos superiores a 20 dias sendo que o potencial fertilizante destes pode ser preservado por pelo menos nove dias (Verstegen et al., 2005). A taxa de prenhes com o uso de sêmen diluído em meio TRIS-Glucose-Citrato, mantidos entre sete e 11 dias a 4°C é de 70%, próximo ao descrito para uso de sêmen fresco (Verstegen et al., 2005).

O congelamento de sêmen, ao contrário do resfriamento, permite o armazenamento de material genético por período de tempo indeterminado, levantando assim um grande interesse junto à comunidade científica e proprietários de reprodutores de alto padrão genético. Embora o primeiro nascimento de filhotes com o uso de sêmen congelado tenha sido relatado a quase 40 anos (Seager em 1969, citado

por Stefano et al., 1994), ainda hoje a taxa de concepção com o uso de sêmen canino descongelado é geralmente mais baixa que a observada para as outras espécies, em torno de 30 a 60% com inseminação intravaginal e 50 a 80 % com inseminação intrauterina (Fontbonne e Badinand, 1993; Wilson 1993; Silva et al., 1996; Linde-Forsberg 2001; Nizanski, 2005). Embora a acurácia na identificação do momento ideal de inseminação da cadela seja um fator determinante para a baixa fertilidade observada nesta espécie, a baixa longevidade e motilidade do espermatozóide descongelado associado a sua pobre penetração no ovócito são importantes entraves à disseminação do uso do sêmen congelado canino (England, 1993; Rota et al., 1999; Linde-Forsberg et al., 1999; Thomassen et al., 2006). Muitos fatores influenciando a qualidade do sêmen através do processo de criopreservação são conhecidos, incluindo: a técnica de coleta; o protocolo de centrifugação; a composição do meio diluidor; a concentração final de espermatozóides; a associação entre crioprotetores, taxa de resfriamento e taxa de congelamento, bem como a associação entre taxa de congelamento e de descongelamento (Schäfer-Somi et al., 2005).

A centrifugação é uma alternativa amplamente utilizada nos procedimentos de criopreservação de sêmen no intuito de concentrar os espermatozóides e eliminar o plasma seminal (Rijsselaere et al., 2002; Versteegen et al., 2005). Em algumas espécies, o contato prolongado dos espermatozóides com alguns componentes do plasma seminal é associado à queda da motilidade e viabilidade espermática (Aurich, 2005). Embora muitas vezes necessária, tanto a centrifugação como a ressuspensão do *pellet* de espermatozóides dela resultante podem induzir lesões na membrana espermática que se refletem na perda da motilidade e fertilidade do sêmen (Aurich, 2005). Se por um lado o dano à membrana dos espermatozóides durante a centrifugação é proporcional à sua velocidade e duração, por outro, centrifugações muito suaves resultam na perda de grandes proporções de espermatozóides, eliminados suspensos no plasma seminal (Rijsselaere et al., 2002). Vários protocolos de centrifugação do sêmen canino têm sido testados no intuito de minimizar os efeitos deletérios sobre a membrana espermática e potencializar a recuperação de espermatozóides após a centrifugação, entretanto, até o momento não se tem um consenso a respeito da velocidade e duração ideal da centrifugação do sêmen canino (Rijsselaere et al., 2002).

O processo de criopreservação de sêmen tem vários aspectos potencialmente danosos às células, entre os principais estão: variação na temperatura gerando o “choque frio”; a formação e posterior dissolução de cristais de gelo e o estresse

osmótico conhecido como “efeito solução” (Hammerstedt et al., 1990; Holt, 2000; Watson 2000; Pesch e Bergmann, 2006). Ao se expor espermatozoides a queda de temperatura ocorre, proporcionalmente á rapidez do resfriamento, danos estruturais na membrana e alterações metabólicas na célula que se refletem na diminuição irreversível da motilidade espermática, sendo este fenômeno conhecido como choque frio (Amann e Pickett, 1987; Holt, 2000). As membranas biológicas são compostas basicamente de lipídeos e proteínas, arranjados em uma bicamada fluida que permite a livre movimentação de seus componentes a fim de manter uma distribuição aleatória dos mesmos (Amann e Pickett, 1987; Hammerstedt et al., 1990). À medida que se inicia o resfriamento dos espermatozoides e particularmente entre 5 e -15°C ocorrem mudanças no estado físico dos lipídeos que alteram sua fluidez. Esta diminuição na fluidez leva a formação de regiões de grande concentração de lipídeos onde há aumento da permeabilidade (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 2000). A alteração da fluidez provoca ainda agregação e alteração de estrutura das proteínas, o que, no caso daquelas formadoras de canais iônicos e receptores de membrana, pode prejudicar a fertilidade do sêmen por diminuir a capacidade do espermatozoide de se ligar ao óvulo (Holt, 2000; Bailey et al., 2000).

Entre os lipídios componentes da membrana celular o colesterol tem papel fundamental na sobrevivência da célula ao processo de congelamento, uma vez que ele torna a membrana naturalmente menos flexível e fluida e desta forma, menos susceptível a alterações (Bailey et al., 2000; Holt, 2000). A proporção de ácidos graxos insaturados e saturados presentes na membrana também influencia sua susceptibilidade a crioinjúrias, uma vez que determina uma maior ou menor tendência a sofrer alterações conformacionais quando exposta a baixas temperaturas (Amann e Pickett, 1987; Hammerstedt et al., 1990). A composição lipídica da membrana celular dos espermatozoides varia significativamente entre espécies e mesmo entre indivíduos da mesma espécie explicando de certa forma, variações observadas na congelabilidade do sêmen (Cross, 1998, Watson, 2000).

Durante o resfriamento de uma solução de células, quando se atinge temperaturas menores que -5°C, inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular, diminuindo desta forma a proporção de água livre na solução e conseqüentemente aumentando a concentração osmótica de seus solutos (Hammerstedt et al., 1990, Watson, 2000). Quanto mais baixa a temperatura menor a porção de água não congelada e maior a concentração de solutos (Watson, 2000).

Esta alteração na osmolaridade do meio leva a célula a desidratar antes do congelamento total, prevenindo a formação de cristais de gelo no citoplasma e conseqüentemente lesão de membranas e organelas (Hammerstedt et al., 1990, Watson, 2000). Uma acentuada desidratação, entretanto, pode provocar precipitação dos solutos citoplasmáticos, distúrbios no pH e diminuição no volume celular abaixo dos valores compatíveis com a sobrevivência, sendo este fenômeno conhecido como efeito soluto (England, 1993). Desta forma, taxas de congelamento de sêmen muito lentas podem levar a excessiva desidratação do espermatozóide e morte em decorrência do efeito soluto, enquanto taxas muito rápidas não permite a saída suficiente de água do fluido intracelular permitindo a formação de cristais de gelo (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 2000). Uma taxa de congelamento ideal deve balancear os efeitos negativos e positivos da formação de cristais de gelo e da desidratação celular no intuito de obter máxima sobrevivência de espermatozoides ao descongelamento

Componentes do meio diluidor conhecidos como crioprotetores agem de uma forma geral aumentando a osmolaridade do meio e tornando mais eficiente a desidratação celular durante o congelamento (England, 1993). Um dos primeiros crioprotetores descobertos e até hoje o mais amplamente utilizado é o glicerol. Ele age diminuição do ponto de congelamento das soluções e desta forma prevenindo a formação de cristais de gelo intracelulares e atenuando o “efeito solução” (Amann e Pickett, 1987; Santos et al., 2003; Holt, 2000). Embora o glicerol mostre-se extremamente eficiente como crioprotetor sabe-se que ele apresenta efeito tóxico sobre o espermatozóide, em determinadas concentrações e temperaturas, entretanto, a toxicidade do glicerol varia significativamente entre as diferentes espécies (Fahy, 1986; England, 1993; Holt, 2000; Santos et al., 2003; Pesch e Bergmann, 2006). A maioria dos trabalhos em congelamento de sêmen de cão utiliza meio contendo 4% de glicerol, mas este crioprotetor vem sendo testado em concentrações que variam de 1 a 16%, na busca de um perfeito ajuste entre seus efeitos crioprotetores e tóxicos (Peña et al., 1998; Santos et al., 2003). Weiss et al., (2000) avaliando o congelamento de sêmen canino em meios contendo 5 e 6 % de glicerol verificaram melhor motilidade progressiva e integridade acrossomal nas amostras congeladas com 6% de glicerol. Peña et al., (1998) avaliaram o congelado de sêmen em meio Tris-Citrato contendo 2, 4, 6 e 8% de glicerol e relataram melhores resultados com meio contendo 8 % de glicerol. Da mesma forma, Santos et al., (2003) avaliando a

qualidade do sêmen canino congelado em meio Tris-Citrato contendo 4, 6, 8 e 10% de glicerol e também concluíram que as amostras congeladas com meio contendo 8% de glicerol apresentaram melhores resultados. Rota et al. (1998) avaliaram o congelamento de sêmen canino em meio contendo 3 e 5% de glicerol e verificaram melhor qualidade do sêmen congelado em meio com 5 % de glicerol.

Além da escolha do crioprotetor o protocolo de congelamento de sêmen, incluindo taxa de resfriamento, tempo de equilíbrio e taxa de congelamento, também apresenta efeito determinante no sucesso do congelamento do sêmen. A taxa de resfriamento representa a velocidade em que se resfria o sêmen da temperatura corporal ou ambiente até 4°C, sendo taxas muito rápidas associados a maiores danos em decorrência do choque frio (Watson, 2000). O tempo de equilíbrio representa uma pausa durante o protocolo de congelamento na qual o sêmen é mantido por determinado período de tempo a temperaturas próximas de 4°C. Esta pausa possibilita o desenvolvimento de máxima resistência do espermatozóide aos efeitos deletérios do congelamento, através de adequada penetração do glicerol, influxo de íons e alterações de membrana (Watson, 1979; England, 1993, Santos et al., 2003). Estudos a respeito das taxas de resfriamento e tempo de equilíbrio demonstram que em espécies como o bovino até 16 horas de equilíbrio podem ser necessárias para desenvolvimento de relativa resistência ao choque frio (Watson, 2000). Por outro lado, Bouchard et al. (1990) estudando o resfriamento de sêmen canino a 4°C afirmaram que os espermatozoides de cão seriam mais resistentes ao choque frio que as demais espécies. Santos et al. (2003) avaliando protocolos de congelamento de sêmen de cão com 1, 2, 3, e 4 horas de tempo de equilíbrio relatam que os melhores resultados foram com obtido com 1 hora de resfriamento. Em experimentos piloto desenvolvidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UVF) com várias espécies de felinos, não foi observado a necessidade de inclusão de tempo de equilíbrio nos protocolos de congelamento de sêmen, sendo o congelamento bem sucedido utilizando curva de resfriamento de 1 hora seguida de congelamento em vapor de nitrogênio líquido.

Uma grande variedade de taxas de congelamento tem sido descritas na literatura na busca de uma perfeita interação com: os componentes do meio, taxa de resfriamento e tempo de equilíbrio. O congelamento de sêmen pode ser feito utilizando aparelhos congeladores biológicos nos quais é possível programar diferentes taxas de congelamento para diferentes intervalos de temperatura. Ótimas

taxas de congelamento são descritas entre -10 e -100°C/min denotando grande variação entre diferentes protocolos (England 1993). Foote (1964) usando um aparelho de congelamento biológico comparou diversas curvas de congelamento em diferentes etapas do processo e constatou que curvas mais lentas foram superiores às aquelas mais rápidas, já Olar et al. (1984) concluiu que curvas intermediárias foram superiores às demais estudadas. O congelamento de sêmen pode ainda ser realizado em caixas de isopor contendo nitrogênio líquido nas quais é possível variar a taxa de congelamento através do posicionamento das palhetas contendo o sêmen a variáveis distâncias da lâmina de nitrogênio. Smith (1984) comparou 4 protocolos de congelamento de sêmen canino em caixa de isopor, nos quais o congelamento era feito a 3,8; 10,2 e 20,3 cm da lâmina de nitrogênio e constatou que a altura de 20,3 cm seria ideal. Também Dobrinski et al. (1993) aponta a distância de 20 cm como ideal para congelamento de sêmen com diferentes meios diluidores. Nothing e Shuttleworth (2005) avaliaram duas taxas de congelamento para sêmen canino posicionando as palhetas a 3.5 e 8 cm da lâmina de nitrogênio. Os autores testaram simultaneamente palhetas de diferentes capacidades (0.5 e 0.25 ml) e duas curvas de descongelamento (uma a 37°C e outra a 70°C), e concluíram que, em seu trabalho, o melhor protocolo foi o que utilizou a taxa lenta de congelamento. Rota et al. (1998) avaliaram o congelamento de sêmen canino, com duas taxas de congelamento e duas taxas de descongelamento, em meio contendo 3 e 5% de glicerol e não observaram influência da taxa de congelamento sobre a motilidade espermática e integridade de membrana espermática no sêmen descongelado.

2.3-Os parâmetros de avaliação do sêmen e suas correlações entre si e com a fertilidade

Um dos grandes entraves ao melhoramento da técnica de criopreservação de sêmen em cães é a forma de estimar a fertilidade do sêmen após o descongelamento. Testes *in vivo*, embora decisivos na determinação da fertilidade do sêmen, requerem um grande número de animais por tratamento avaliado e estão sujeitos a variações outras que não a qualidade do sêmen como: a fertilidade individual da fêmea, a detecção do momento ótimo de inseminação, o método de inseminação, a dose e volume inseminante, entre outros (Eilts, 2005). Análises feitas *in vitro* por sua vez são bastantes práticas e possibilitam a avaliação simultânea de

grande número de tratamentos, entretanto, para serem conclusivas, necessitam de prévia confirmação de sua correlação com a taxa de fertilidade através de testes *in vivo*.

Os parâmetros *in vitro* mais comumente utilizados para estimar a fertilidade do sêmen congelado são: avaliação da movimentação do espermatozóide, da integridade e viabilidade da membrana espermática e a longevidade espermática. A movimentação dos espermatozoides é normalmente avaliada em termos de motilidade (porcentagem de espermatozoides móveis de 0 a 100%) e o vigor (intensidade do movimento de 0 a 5) (CBRA, 1998). Estes valores representam bons indicadores da função espermática uma vez que a movimentação é uma manifestação dos componentes estruturais e funcionais do espermatozóide, altamente correlacionada com a taxa de fertilidade, normalidade morfológica e integridade da membrana espermática (Smith et al., 1977; Oettlé, 1993; Peña Martínez, 2004; Thomassen et al., 2006). Quando se pensa entretanto em estudos com vários tratamentos, a avaliação da movimentação do espermatozóide através de valores de vigor e motilidade torna a comparação entre tratamentos pouco eficiente, uma vez que se tem de comparar dois valores distintos relativos a um mesmo parâmetro. Desta forma alguns autores utilizam como parâmetro de movimentação do espermatozóide o índice espermático ($IE = [M + (V \times 20)] / 2$, onde M = motilidade espermático e V = vigor espermático) que consiste de uma média entre o vigor e a motilidade na qual ambos têm a mesma significância (Morais et al., 2002).

A integridade e viabilidade da membrana espermática pode ser avaliada através do teste hiposmótico e do teste de colorações supravitais. O teste hiposmótico baseia-se na reação de enrolamento da cauda do espermatozóide intacto, com membrana citoplasmática funcional quando exposto a um meio hiposmótico (England e Plummer, 1993). Em cães o teste hiposmótico foi correlacionado positivamente com a motilidade espermática e com o teste de coloração supravital com eosina-nigrosina (Kumi-Diaka, 1993; Rodriguez-Gil et al., 1994; Pinto e Kozink, 2007). Neild et al., (2000) estudando a aplicação do teste hiposmótico na avaliação do sêmen fresco de garanhões observaram correlação entre o resultado obtido no teste e a taxa de prenhes, a porcentagem de espermatozoides móveis e morfológicamente normais no ejaculado. As colorações supra-vitais são classicamente utilizadas para diferenciar espermatozoides vivos e mortos (Dott e Foster, 1972; Peña Martínez, 2004; Pinto e Kozink, 2007; Kustritz, 2007). A

coloração supravital com eosina-nigrosina é a mais comumente utilizada e consiste basicamente de diferenciação dos espermatozóides vivos e mortos através de sua afinidade com o corante eosina (Dott e Foster, 1972). Embora esta técnica sofra interferência dos componentes do meio diluidor, em especial a gema de ovo e o glicerol (Peña Martínez, 2004; Kustritz, 2007), os resultados obtidos no teste de coloração supravital com eosina-nigrosina tem sido correlacionados com a motilidade espermática (England e Plummer, 1993) e a integridade de membrana espermática avaliada pelo método de citometria de fluxo (Martins-Bessa, 2006).

A longevidade espermática *in vitro* pode ser avaliada pela incubação do sêmen a temperatura corporal no intuito de mimetizar as condições encontradas no trato genital feminino (Teste de Termorresistência). Durante o teste de termorresistência o sêmen descongelado é incubado a temperaturas que variam de 37 a 39°C por períodos até seis horas, durante o qual se avalia a movimentação espermática (Fontbonne e Badinand, 1993; Peña et al., 1998). Este teste é tido como um bom preditor da fertilidade espermática em várias espécies e baixas taxas de sobrevivência no teste de termorresistência tem sido associadas com baixa fertilidade (England, 1993). O sêmen canino tem a característica particular de baixo desempenho no teste de termorresistência pós o descongelamento, quando comparado ao de outras espécies. Esta característica de baixa termorresistência entretanto, não é necessariamente associada à baixa fertilidade visto que em alguns estudos, amostras de sêmen com relativo baixo desempenho no teste de termorresistência apresentaram taxas de fertilidade normais (Cardoso et al., 2005).

2.4 - Referências Bibliográficas

AMANN, R. P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Sci** , v.7, p.145-173, 1987.

ANFAL PET - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO . *Perfil da população de cães e gatos e evolução do mercado*, 2007. Disponibilidade de acesso: <<http://www.anfalpet.org.br>>. Acessado em 6 de novembro de 2007.

- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim. Repro. Sci.**, v.89, p. 65-75, 2005.
- BAILEY, L.J.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Andrology**, v.21, n.1, p.1-7, 2000.
- BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R.S. Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v.34, n.1, p.147-157, 1990.
- CARDOSO, R. C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.29, n.314, p.179-187, 2005.
- CBKC - CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE KENNES KLUBS. *Relatório anual de atividades cinófilas*, 2005. Disponibilidade e acesso: <<http://www.cbkc.org.br>> Acessado em 5 de novembro de 2007.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal** (2ed), Belo Horizonte, CBRA, 49p, 1998.
- CROSS, N. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol. Reprod.**, v.59, p.7-11, 1998.
- DOBRINSKI, I.; LULAI, C.; BARTH, A.D.; POST, K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on pos-thaw viability of dog semen. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.291-296, 1993.
- DOTT, H.M. E FOSTER, G.C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential "live/dead" stain. **J. Reprod. Fert.**, v.29, p.443-445, 1972.

- EILTS, B.E. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. **Theriogenology**, v.64, p.685-691, 2005.
- ENGLAND, G.C. Criopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fert. Suppl**, v.47, p.234-255, 1993.
- ENGLAND, G.C. and PLUMMER, J.M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. **J. Reprod. Fert. Suppl**, v.47, p. 216-270, 1993.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13,1986.
- FONTBONNE, A.; BADINAND, F. Estudios on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. **J. Reprod. Fert. Suppl**, v.47, p.531-532, 1993.
- FOOTE, R.H.; Extenders for freezing dog semen. **Ame. J. Vet. Resea.**, v.25, p.370-390, 1964.
- GOBELLO, C.; CORRADA, Y. Biotecnology in canine reproduction: an update. **Acta Veterinaria**, v.23, n.1, p.30-37, 2003.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Andrology.**, v.11, n.1, p.73-87, 1990.
- HARROP, A.E. Artificial insemination in dogs, first transatlantic conception. **Brit. Vet. J**, v.112, p.338-340, 1956.

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

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. *Lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção*, 2007. Disponibilidade e acesso: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acessado em 6 de novembro de 2007.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. 2003. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/>>. Acessado em: 7 jan. 2007.

IUCN - THE WORLD CONSERVATION UNION. *Red List of Threatened Species*, 2007. Disponibilidade e acesso: <<http://www.iucn.org>>. Acessado em 6 de novembro de 2007.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, p. 1279-1289, 1993.

KUSTRITZ, M.V.R. The value of canine semen evaluation for practitioners. **Theriogenology**, v.68, p.329-337, 2007.

LEPPÄNEN, M.; MÄKI, K.; SALONIEMI, H. Estimation of heritability of hip dysplasia in German Shepherd Dogs in Finland. **J. Ani. Breed. Geneti.**, v. 117, p.97-103, 2000.

LEROY, G.; ROGNON, X.; VARLET, A.; JOFFRIN, C.; VERRIER, E. Genetic variability in french dog breeds assessed by pedigree data. **J. Ani. Breed. Geneti.**, v. 123, p.1-9, 2006.

LINDE-FORSBERG,C. Intra-uterine insemination in the dog using the Scandinavian trans-cervical catheter and a comparison with other methods. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca, New York, 2001. Disponibilidade e acesso: <<http://www.ivis.org>>. Acessado em 21 de agosto de 2007.

LINDE-FORSBERG,C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. **Sem. Vet. Med and Surg. (Small Animal)**, v.10, n.1, p.48-58, 1995.

LINDE-FORSBERG, C.; STROM HOLST, B.; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. **Theriogenology** , v.52, p.11-23, 1999.

LUVONI. G.C.; CHIGIONI,S.; BECCAGLIA, M. Embryo production in dogs: from *in vitro* fertilization to cloning. **Reprod. Dom. Ani.**, v.14, p.286-290, 2006.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. **Theriogenology**, v.66, p.2047-2055, 2006.

MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, 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 oncelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.2027-2041, 2002.

NEILD, D.M.; CHAVES, M.G.; FLORES, M.; et al. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**, v.32, p.351-355, 2000.

NIZANSKI, W. Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: use of an infusion pipett and the Osiris catheter. **Theriogenology**, v.66, p.470-483, 2006.

NIZANSKI, W. Comparisons of results of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with frozen-thawed semen. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. v8,n.4, p.1-6, 2005. Disponibilidade e acesso: <<http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue4/art-12.html>>. Acessado em 12 de agosto de 2007.

NÖTHLING, J.O.; SHUTTLEWORTH, R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. **Theriogenology**, v.63, p.1469-1480, 2005.

OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **J. Rep. Fert. Suppl.**, v.47, p.257-260, 1993.

OLAR, T.T. Criopreservation of dog spermatozoa. Colorado, 1984. Tese de Pós-Doutorado – Colorado State University.

PATTERSON, D.F. Understanding and controlling inherited diseases in dog and cat. **Tidjschr. Diergeneeskd.**, n. 118, p.23-27, 1993.

PEÑA MARTÍNEZ, A.I. Canine fresh and cryopreserved sêmen evaluation. **Anim. Repro. Scie.**, v.82-83, p.209-224, 2004.

PEÑA, F.J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J.M. Sêmen technologies in dog breeding: an update. **Reprod. Dom. Ani.**, Supp. 12, v.41, p.21-29, 2006.

- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A. HERRADÓN, P.G. Effects of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-174, 1998.
- PESCH, S.; BERGMENN, M.; Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p.597-612, 2006.
- PINTO, C.R.F.; KOZINK, D.M. Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, (2007), doi: 10.1016.2007.07.005.
- REICHMANN, M.L.A.B.; PINTO, H.B.F.; NUNES, V.F.P. *Vacinação contra raiva de cães e gatos*. São Paulo: Instituto Pasteur, 1999. Disponibilidade de acesso: <<http://pasteur.saude.ps.gov.br>>. Acessado em 6 de novembro de 2007.
- RIJSEELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**, v.64, p.706-719, 2005.
- RIJSEELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1669-1681, 2002.
- RODRIGUEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.42, p.815-829, 1994.
- ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. et al. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. **Theriogenology**, v.51, p.1045-1058, 1999.

- ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J.; ROMAGNOLI, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations na freezing/thawing rates. **Reprod. Dom. Ani.**, v.33, p.355-361, 1998.
- SANTOS, I.W.; LIMA, V.F.M.H.; NISFELD, L.C.; RIBEIRO, A.P.C. Congelação do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e difetentes tempos de equilíbrio. **Archives Vet. Sci.**, v.8, n.2, p.57-62, 2003.
- SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E.; KLEIN, D.; AURICH, C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, n2, p.173-182, 2005.
- SCHELLING, C.; GAILLARD, C.; DOLF, G. Genetic variability of seven dog breeds based on microsatellite markers. **J. Brees. Genet.**, v.122, p.71-77, 2005.
- SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B. et al. Comparation of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Vet. Rec.**, v.138, p.154-157, 1996.
- SIMITH, F.O. and GRAHAM, E.F. Cryopreservation of canine semen, techniques and performance. **10^o International Congress on Animal Reproduction an Artificial Insemination**, Urbana-Champaign, v.2, p.216, 1984.
- SMITH, K.D.; RODRIGUEZ-RIGAU, L.J.; STEINBERGER, E. Relation between índices of sêmen analysis and preganangy rate in infertile couples. **Fert. Steril.**, v.28, n.12, p. 1314-1319,1977.

STEFANO, B.; ZAMBELLIN D.; BERGONZONI, M.L. L'inseminazione artificiale nel cane con seme congelato. **Praxis Vet.** v.14, n.2, p.12-18, 1994

THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, J.A.; ANDERSEN BERG, K.; FARSTAD, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. **Theriogenology**, v.66, p.1645-1650, 2006.

VERSTEGEN. J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine sêmen using egg yolk added tris-glucose extender: *In vitro* an in vivo studies. **Theriogenology**, v.64, p.720-733, 2005.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p.481-492, 2000.

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v.1, p. 283-350, 1979.

WEISS, R.R.; RODASKI, S.; BÜCHELE, J.M.; SANTOS, I.W.; ALMEIDA, L.M. Estudo preliminary de algumas características do sêmen canino congelado. **Archives Vet. Sci.**, v. 5, p.67-71, 200.

WILSON. M.S. Non-sirurgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **J. Rep. Fert. Suppl.**, v.47, p.307-311, 1993.

3- PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN FRESCO E EFEITO DA CENTIFUGAÇÃO SOBRE A MOTILIDADE E A INTEGRIDADE DE MEMBRANA ESPERMÁTICA DE CÃES DAS RAÇAS BEAGLE, SCHNAUZER, DOBERMAN E BOXER .

Resumo

O presente trabalho busca descrever a análise *in vitro* do sêmen fresco de cães das raças Beagle, Schnauzer, Doberman e Boxer bem como o efeito da centrifugação sobre a motilidade espermática e a viabilidade e integridade da membrana espermática. Para tanto, foram utilizados 12 cães das raças Beagle (n=3), Schnauzer (n=3), Doberman (n=3) e Boxer (n=3). Foram coletados 3 ejaculados por indivíduo, totalizando 36 ejaculados. O sêmen foi avaliado, antes e depois da centrifugação quanto à movimentação dos espermatozoides através de vigor, motilidade e índice espermático e quanto à integridade e viabilidade da membrana espermática pelos testes hiposmótico e de coloração supravital. As médias individuais de vigor e motilidade espermáticos variaram de 3,5 a 5,0 e de 63 a 90% respectivamente enquanto as médias raciais variaram de 4,4 a 4,9 e de 80 a 90% respectivamente. Não foi verificada diferença significativa entre os parâmetros de motilidade espermática e integridade e viabilidade de membrana espermática no sêmen fresco de cães das diferentes raças. A centrifugação do sêmen resultou em queda de cerca de 13% no vigor espermático e 14% na motilidade e no índice espermático. A análise dos parâmetros de viabilidade e integridade de membrana espermática mostra diminuição de 38% e 14% na porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico e de coloração supravital respectivamente. Assim, o protocolo de centrifugação preconizado reduziu marcadamente a motilidade espermática e a integridade e viabilidade da membrana espermática, sendo esta diferença mais claramente percebida através do teste hiposmótico.

Palavras chave: sêmen fresco, raças caninas, centrifugação.

Abstract

The present work intends to describe the *in vitro* analysis of fresh semen from dogs of Beagle (n=3), Schnauzer (n=3), Doberman (n=3) and Boxer breeds as well as the effect of centrifugation upon sperm motility and plasma membrane viability and integrity. For that, semen from 12 dogs was collected by digital manipulation and centrifuged at 300g per 10 minutes. The semen was evaluated, before and after the centrifugation for spermatozoa movement through motility, progressive status, and sperm index and for plasma membrane integrity and viability through hiposmotic swelling tests and live/dead stain. The individual averages of sperm motility and progressive status in the fresh semen had varied from 3.5 to 5.0 and 63 to 90% respectively, while the breed averages had varied of 4.4 the 4.9 and 80 to 90% respectively. The semen centrifugation resulted in significant fall of 13% in progressive status and 14% in the motility and spermatic index. The analysis of plasma membrane viability and integrity parameters in the semen after centrifugation shows significant reduction of 38% and 14% in the reactive cells to the hiposmotic swelling test and to supravital coloration respectively. In the present work the centrifugation protocol clearly reduced sperm motility and plasma membrane viability and integrity, and this effect was easily observed in the hiposmotic swelling test

Key words: fresh semen, canine breeds, centrifugation.

3.1 - Introdução

Nas últimas décadas o crescente interesse na criação de animais de estimação, vem se refletindo particularmente na cinofilia especializada, onde se observa aumento do investimento em melhoria zootécnica dos animais através de programas de melhoramento genético e principalmente da importação de reprodutores. O crescente investimento na melhoria zootécnica dos animais cria uma grande demanda por biotecnologias de reprodução assistida que potencializem o aproveitamento de reprodutores de qualidade superior (Peña et al., 2006). Especialmente nos últimos 20 anos técnicas de inseminação artificial e criopreservação do sêmen tem avançado de forma significativa na espécie canina possibilitando o acasalamento de animais que apresentem obstáculos anatômicos a cópula, reduzindo a necessidade de transporte de reprodutores e, principalmente, tornando possível o armazenamento de material genético por períodos de tempo indeterminado (Fontbonne e Badinand, 1993; Silva et al., 1996; Linde-Forsberg et al., 1999; Verstegen et al., 2005; Batista et al., 2006). A inseminação artificial com sêmen fresco apresenta atualmente taxas de concepção semelhantes à observadas em sistemas de monta natural (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Silva et al., 1996). O uso de sêmen criopreservado, no entanto, ainda resulta em menores taxas de concepção, especialmente quando associados à inseminação intravaginal (Fontbonne e Badinand, 1993; Silva et al., 1996; Linde-Forsberg et al., 1999; Verstegen et al., 2005).

Durante procedimentos de inseminação artificial a estimativa da fertilidade das amostras de sêmen é rotineiramente feita pela avaliação de parâmetros como concentração, motilidade espermática e morfologia espermática. Entretanto a maioria das criações de cães utiliza sistemas de monta natural onde os reprodutores são pouco exigidos, uma vez que a proporção macho : fêmea é baixa e permite diversos cruzamentos a cada ciclo estral (Rijsselaere et al., 2005). Em consequência, pouca atenção tem sido dispensada à determinação de padrões de subfertilidade e infertilidade na espécie canina. E embora o cão seja a espécie doméstica que apresenta o maior número de raças reconhecidas, poucos são os relatos a respeito da qualidade seminal nas diferentes raças (Schelleng et al, 2005; Batista et al., 2006).

O sêmen canino é ejaculado em três frações. A maioria dos espermatozóides é ejaculado na fração intermediária, sendo a primeira e a última fração do ejaculado em sua maioria de origem prostática. Nos procedimentos de inseminação artificial com

sêmen fresco em geral a segunda fração é coletada separadamente, entretanto, quando não é possível separar as frações do ejaculado ou quando o sêmen destina-se a criopreservação, a centrifugação é uma alternativa amplamente utilizada no intuito de concentrar os espermatozóides e eliminar o plasma seminal (Rijsselaere et al., 2002; Versteegen et al., 2005). Em algumas espécies, o contato prolongado dos espermatozóides com alguns componentes do plasma seminal é associado à queda da motilidade e viabilidade espermática (Aurich, 2005). Embora muitas vezes necessária, tanto a centrifugação como a ressuspensão do *pellet* de espermatozóides dela resultante podem induzir lesões na membrana espermática que se refletem na perda da motilidade e fertilidade do sêmen (Aurich, 2005). Se por um lado o dano à membrana dos espermatozóides durante a centrifugação é proporcional à sua velocidade e duração, por outro, centrifugações muito suaves resultam na perda de grandes proporções de espermatozóides, eliminados suspensos no plasma seminal (Rijsselaere et al., 2002). Vários protocolos de centrifugação do sêmen canino têm sido testados no intuito de minimizar os efeitos deletérios sobre a membrana espermática e potencializar a recuperação de espermatozóides após a centrifugação, entretanto, até o momento não se tem um consenso a respeito da velocidade e duração ideal da centrifugação do sêmen canino.

Assim, o presente trabalho visa à descrição da análise *in vitro* do sêmen fresco de cães das raças Beagle, Schnauzer, Doberman e Boxer, bem como o efeito da centrifugação sobre a motilidade espermática e integridade e viabilidade da membrana espermática.

3.2 – Materiais e Métodos

Foram utilizados 12 cães machos adultos, clinicamente sadios, das raça Beagle (n=3), Schnauzer (n=3), Boxer (n=3) e Doberman (n=3). Os animais pertenciam a canis especializados na criação das respectivas raças sendo todos reprodutores com histórico prévio de fertilidade. Antes do início do trabalho os cães passaram por completo exame clínico e andrológico, sendo selecionados para o experimento aquele que apresentassem os parâmetros físicos e morfológicos seminais julgados dentro dos padrões considerados normais para a espécie (CBRA, 1998).

O sêmen foi coletado, em alíquota única, contendo a fração espermática, pelo método de manipulação digital, em tubos de centrifuga graduados acoplados a um funil de plástico, sendo o conjunto aquecido antes da coleta e o tubo de centrifuga mantido dentro de recipiente contendo água a 38°C. Foram realizadas três coletas por indivíduo, com intervalo de 48 horas entre as coletas.

Imediatamente após a coleta o sêmen foi mantido em banho-maria a 38°C, enquanto uma alíquota de 20µL foi posta em lâmina previamente aquecida e coberta com lamínula para avaliação do vigor (intensidade de movimento classificada de 0 a 5) e motilidade espermática (porcentagem de espermatozóides móveis classificada de 0 a 100%) em aumento de 100 e 400x. Posteriormente estes valores foram utilizados para confecção do índice espermático (IE) através da fórmula: $IE = [M + (V \times 20)] / 2$, onde M = motilidade espermática e V = vigor espermático (Morais et al., 2002). A integridade da membrana espermática foi avaliada através dos testes hiposmótico e de coloração supravital. O teste hiposmótico baseia-se na reação de enrolamento da cauda do espermatozóide. Isto é observado quando um espermatozóide com membrana citoplasmática funcional é exposto a um meio hiposmótico. Desta forma para realização deste teste uma amostra de 20 µL de sêmen foi incubada a 38°C por meia hora em 0,5 mL de solução de frutose e citrato de sódio a 60 mosmol (Rota et al., 2006). Em seguida 100 células foram observadas em microscopia ótica com 400 vezes de aumento para contabilização do percentual bruto de espermatozóides com cauda enrolada ou reativos ao teste hiposmótico (HO^B). Dentro deste total bruto um parcela dos espermatozóides já apresentavam cauda enrolada mesmo antes do teste hiposmótico, assim, o valor bruto de espermatozóides com cauda enrolada foi corrigido excluindo-se da população total a parcela com caudas enrolada contabilizada antes do teste hiposmótico (ENR). Para isto uma alíquota de 20 µL do sêmen foi adicionada a 0,5 mL de formol salina tamponada e avaliada ao microscópio de luz quanto à proporção especificamente de caudas enroladas. Desta forma o percentual corrigido de células reativas ao teste hiposmótico foi calculado no presente trabalho através da formula: $HO^C = (HO^B - ENR) / (100 - ENR)$. Os valores foram apresentados na forma de porcentagem.

Para o teste de coloração supravital 20 µL de sêmen foram adicionados a 40µL de corante eosina-nigrosina previamente aquecidos por 40 segundos. Em seguida foi confeccionado um esfregaço em lâmina e imediatamente seco ao ar e

observado em aumento de 400x para contabilização dos espermatozóides corados, sendo estes computados como lesionados.

Após estas análises a concentração espermática foi mensurada, em câmara hematimétrica, por meio da diluição de 20 µL de sêmen em 1 mL de formol salino tamponado e contagem das células presentes dentro do espaço da câmara, sendo a concentração determinada com base no fator de diluição. O número total de espermatozóides por ejaculado foi obtido multiplicando-se a concentração espermática pelo volume total coletado. O número total de espermatozóides móveis no ejaculado foi calculado multiplicando-se o número total de espermatozóides ejaculados pela porcentagem de espermatozóides móveis. Em seguida o sêmen foi centrifugado a 300g por dez minutos.

Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado gentilmente ressuspensionado em meio diluidor a base Tris-citrato (Anexo 1) de forma a obter-se concentração final de 100×10^6 espermatozóides/mL. Em seguida os parâmetros de motilidade espermática e integridade de membrana espermática foram reavaliados como descrito para o sêmen fresco.

Os dados avaliados foram descritos quanto à média e respectivo desvio padrão. Para a comparação das médias foi calculado o intervalo médio de confiança com margem de 5% de erro através da função estatística do programa Excel Windows XP.

3.3 – Resultados e Discussão

Um grande número de estudos têm sido conduzidos na espécie canina no intuito de avaliar a motilidade espermática seja no sêmen a fresco ou após criopreservação (Silva et al., 1996; Nöthling et al., 1997; Rota et al., 1999). No entanto, a maioria destes trabalhos utiliza sêmen de animais de diferentes raças ou mesmo de animais sem raça definida agrupados em “pools”, de forma que não é possível avaliar individualmente a qualidade do sêmen (Rota et al., 1995; Peña et al., 1998; Peña e Linde-Foresberg, 2000; Santos et al., 2003; Martins-Bessa et al., 2006). No presente trabalho as médias individuais de vigor e motilidade espermáticas variaram de 3,5 a 5,0 e de 63 a 90% respectivamente, enquanto as médias raciais variaram de 4,4 a 4,9 e de 80 a 90% respectivamente. (Tabela 1). Estes valores são similares aos descritas em cães da raça Beagle (Silva et al., 1996, 90%; Versteegen et

al.2005, 85-95%), Mastiff (Batista et al., 2006, 90%), Retriever do Labrador (Bueno et al., 2002, 93%) e Poodle (Yamashiro et al., 2007, 70%). A avaliação da motilidade espermática por meio de visualização do sêmen ao microscópio, embora bem correlacionada com a fertilidade, é um método de avaliação subjetivo e desta forma, sujeito a variações entre diferentes laboratórios e examinadores (Rijsselaere et al., 2005). As discretas diferenças observadas nos valores médios de vigor e motilidade do sêmen fresco entre estudos com diversas raças caninas são possivelmente atribuídas a diferenças nos parâmetros individuais de avaliação entre pesquisadores, não refletindo assim variações efetivas na motilidade do sêmen entre as raças

Tabela 1- Vigor, motilidade e índice espermático e porcentagem de células reativas ao teste de coloração supravital e teste hiposmótico no sêmen fresco de cães da raça Beagle, Schnauzer, Doberman e Boxer. Total de espermatozóides ejaculados e total de espermatozóides móveis ejaculados nas diferentes raças.

	Vigor Espermático (0-5)	Motilidade Espermática (%)	Índice Espermático (%)	Coloração Supravital (%)	Teste Hiposmótico (%)	Total de Espermatozóides Ejaculados (10 ⁶)	Total de Espermatozóides Móveis Ejaculados (10 ⁶)
Beagle							
1	5,0	86,7	93,3	10,5	88,2	453,3	394,0
2	4,3	83,3	85,0	4,3	77,2	200,0	166,7
3	5,0	90,0	95,0	5,5	94,7	380,0	342,0
–	4,8 ± 0,4	86,3 ± 4,4	90,6 ± 5,5	6,4 ± 4,1	85,7 ± 10,0	340,0 ± 126,0	295,8 ± 116,3
X	(8,0)	(5,1)	(6,0)	(64,0)	(11,6)	(37,1)	(39,3)
Schnauzer							
1	5,0	90,0	95,0	4,3	97,9	466,7	420,0
2	4,2	85,0	86,7	8,7	78,5	310,0	262,7
3	3,5	80,0	80,0	17,0	52,1	150,0	120,0
–	4,4 ± 0,6	86,4 ± 4,8	89,3 ± 6,1	8,0 ± 5,9	83,1 ± 16,9	354,3 ± 138,3	309,7 ± 130,3
X	(13,7)	(5,5)	(6,8)	(73,6)	(20,4)	(39,0)	(42,1)
Doberman							
1	5,0	90,0	95,0	4,3	92,9	516,7	465,0
2	4,7	86,7	90,0	8,5	95,2	446,7	387,7
3	4,2	63,3	73,3	24,3	81,6	370,0	239,0
–	4,6 ± 0,6	80,0 ± 15,0	86,1 ± 11,4	12,9 ± 11,4	89,9 ± 9,9	444,4 ± 98,2	363,9 ± 123,3
X	(13,0)	(18,8)	(13,2)	(88,5)	(11,0)	(22,1)	(33,9)
Boxer							
1	5,0	90,0	95,0	4,7	93,1	373,3	336,0
2	4,7	90,0	91,7	21,0	95,6	683,3	615,0
2	5,0	90,0	95,0	6,7	94,4	733,3	660,0
–	4,9 ± 0,3	90,0 ± 0,0	93,9 ± 3,3	7,9 ± 6,9	94,4 ± 3,8	596,7 ± 291,7	537,0 ± 262,5
X	(6,8)	(0,0)	(3,6)	(87,4)	(4,1)	(48,9)	(48,9)

Dados apresentados em Média ± Desvio Padrão (Coeficiente de Variação).

Com o objetivo de tornar mais consistente a avaliação da movimentação dos espermatozóides, foi também confeccionado o índice espermático, com variação de

86 a 94% (Tabela 1), o qual consiste de uma média calculada com base nos valores . de vigor e motilidade espermáticos, na qual ambos os valores tem a mesma significância (Morais et al., 2002).

O número de espermatozóides produzidos diariamente é função da massa testicular (Paula e Cardoso, 1995). De maneira geral cães grandes produzem mais espermatozóides que cães pequenos uma vez que a relação entre a massa corporal e testicular é constante nesta espécie (Mascarenhas et al., 2006). Entretanto, além da massa testicular, fatores como frequência de coleta, comportamento, experiência reprodutiva e presença de fêmea em estro influenciam o total de espermatozóides ejaculados. Como esperado, no presente trabalho uma grande variação na concentração total de espermatozóides por ejaculado foi observada entre indivíduos e entre raças (Tabela 1). Os cães da raça Doberman apresentaram concentração total de espermatozóides por ejaculado semelhante ao observado nos cães de pequeno porte, provavelmente devido a pouca familiaridade com o procedimento de coleta de sêmen (Tabela 1).

A centrifugação do sêmen é uma metodologia comumente utilizada nos procedimentos de inseminação artificial e criopreservação de sêmen no intuito de concentrar os espermatozóides e remover o plasma seminal (Rijsselaere et al., 2002; Verstegen et al., 2005). Entretanto, efeitos deletérios da centrifugação sobre a integridade da membrana espermática têm sido associados em várias espécies à queda da motilidade e fertilidade do sêmen (Aurich et al., 2005; Sieme et al., 2006; Matás et al., 2007). Estes efeitos deletérios são provavelmente causados pela oxidação dos ácidos graxos insaturados em consequência do aumento da concentração de oxigênio reativo no plasma seminal (Aurich et al., 2005). Ainda, a ressuspensão dos espermatozóides fortemente compactados no *pellet* formado durante a centrifugação expõe as células a severas injúrias mecânicas (Matás et al., 2007). Embora altas velocidades de centrifugação sejam prejudiciais à qualidade seminal, centrifugações lentas são associadas a baixas taxas de sedimentação dos espermatozóides, especialmente em meios de alta viscosidade (Rijsselaere et al., 2002). Desta forma, vários protocolos de centrifugação do sêmen canino têm sido testados no intuito de minimizar os efeitos deletérios associados à oxidação dos ácidos graxos insaturados e ao mesmo tempo, potencializar a recuperação de espermatozóides após a centrifugação. Rijsselaere et al. (2002) avaliaram o efeito de quatro velocidades de centrifugação sobre a motilidade espermática, a integridade e

viabilidade da membrana espermática e a perda de células na eliminação do sobrenadante e concluíram que a centrifugação a 720g por 5 minutos apresentou perda de células aceitável sem queda da qualidade seminal. Davis et al. (2007) mensuraram a concentração de oxigênio reativo antes e após a centrifugação do sêmen de cães à velocidade de 700g por 10 minutos e verificaram um aumento de 200% na concentração destes após a centrifugação. No presente trabalho a centrifugação do sêmen a 300g por 10 minutos resultou em queda estatisticamente significativa de cerca de 13% no vigor espermático e 14% na motilidade espermática, o que se reflete em uma diminuição de cerca de 14% no índice espermático após a centrifugação. A análise dos parâmetros de viabilidade e integridade de membrana espermática mostra diminuição significativa de 38% e 14% na porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico e de coloração supravital respectivamente (Tabela 2). Shekarriz et al. (1995) estudando diferentes métodos de centrifugação de sêmen humano relatam que não só a velocidade, mas também o tempo de centrifugação influenciam na eficiência do procedimento, sendo recomendável a centrifugação por curtos períodos. Desta forma os danos aos espermatozoides observados no presente trabalho podem estar associados não somente à velocidade da centrifugação mas também à sua duração.

Tabela 2- Vigor, motilidade e índice espermático e porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico e de coloração supra vital no sêmen canino fresco e centrifugado.

	Vigor espermático (0-5)	Motilidade espermático (%)	Índice Espermático (%)	Coloração supravital (%)	Teste hiposmótico (%)
Sêmen fresco	4,7±0,4 ^a (9,5)	85,6±9,8 ^a (11,5)	90,2±8,1 ^a (8,9)	8,8±8,5 ^a (96,5)	92,9±7,7 ^a (8,3)
Sêmen centrifugado	4,1±0,3 ^b (8,4)	73,8±13,5 ^b (18,3)	77,9±9,0 ^b (11,5)	7,6±3,0 ^b (56,3)	57,9±43,0 ^b (5,3)

Dados apresentados em Média ± Desvio Padrão (Coeficiente de variação).

Letras diferentes na mesma coluna representam médias significativamente diferentes (p<0,05).

3.4 - Conclusões

No presente trabalho não foi verificado diferença significativa entre os parâmetros de motilidade espermática e integridade e viabilidade de membrana espermática no sêmen fresco de cães das raças Beagle, Schnauzer, Doberman e Boxer. O protocolo de centrifugação do sêmen fresco que preconiza velocidade de 300g por 10 minutos reduziu significativamente a motilidade espermática e a

integridade e viabilidade da membrana espermática, sendo esta diferença mais claramente percebida através do teste hiposmótico.

3.5 – Referências Bibliográficas

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim. Repro. Sci.**, v.89, n. 65-75, 2005.

BATISTA, M.; ALAMO, D.; GONZÁLES, F.; CRUZ, M.G.; GARCIA, A. Influence of freezing technique (Nitrogen liquid vs Ultrafreezer of -152⁰ C) and male-to-male variation over semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 41, p. 423-428, 2006.

BUENO, R. ; COSTA, E. P. ; GUIMARÃES, J.D.; VALENTIM, F.M. Qualidade espermática de sêmen canino criopreservado. II - Utilização de dois protocolos de resfriamento. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zoo.**, v. 53, n. 3, p. 372-379, 2001.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal** (2ed), Belo Horizonte, CBRA, 49p, 1998.

DAVIS, M.J.; PINTO, C.R.; KOZINSK, D.M.; MINTER, L.J. Detection of reactive oxygen species in canine semen. **Theriogenology**, v.68, 492-518, 2007.

FONTBONNE, A.; BADINAND, F. Estudios on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.531-532, 1993.

LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.39, p.299-310, 1989.

- LINDE-FORSBERG, C.; STROM HOLST, B.; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. **Theriogenology**, v.52, p.11-23, 1999.
- MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. **Theriogenology**, v.66, p.2047-2055, 2006.
- MASCARENHAS, R.M.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; LANNA, L.L.; FONSECA, C.C.; NEVES, M.T.D. Morfometria Macro e Microscópica e Índices Somáticos dos Componentes Testiculares de Cães Sem Raça Definida, da Puberdade à Senilidade. **Revista CERES**, v.53, p.106-112, 2006.
- MATÁS, C.; DECUADRO, G.; MARTÍNEZ-MIRÓ, S.; GADEA, J. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. **Theriogenology**, v.67, p.1087-1091, 2007.
- MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, 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 oncelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.2027-2041, 2002.
- NÖTHLING, J.O.; GERSTENBERG, C.; VOLKMANN, D.H. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.51, p.109-116, 1997.
- PAULA, T.A.R.; CARDOSO, F.M. Alterações etárias na espermatogênese do cão. II. População celular dos túbulos seminíferos e rendimento espermatogênico. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zoo.**, v.47, n.4, p.535-547, 1995.

PEÑA , A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-875, 2000.

PEÑA, F.J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J.M. Sêmen technologies in dog breeding: an update. **Reprod. Dom. Anim.**, Supp. 12, v.41, p.21-29, 2006.

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

RIJSEELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**, v.64, p.706-719, 2005.

RIJSEELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1669-1681, 2002.

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparison between glycerol and ethyleneglycol for dog semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1848-1858, 2006.

ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. et al. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. **Theriogenology**, v.51, p.1045-1058, 1999.

ROTA, A.; STÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; Effects of seminal plasma and three extenders on canine sêmen stored at 4⁰C. **Theriogenology**, v.44, p.885-900, 1995.

- SANTOS, I.W.; LIMA, V.F.M.H.; NISFELD, L.C.; RIBEIRO, A.P.C. Congelação do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio. **Arch. Vet. Sci.** v.8, n.2, p.57-62, 2003.
- SCHELLING, C.; GAILLARD, C.; DOLF, G. Genetic variability of seven dog breeds based on microsatellite markers. **J. Breed. Genet.**, v.122, p.71-77, 2005.
- SHEKARRIZ, M.; DE WIRE, D.M.; THOMAS JR, A.J.; AGARWAL, A. A method for human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **Eur. Urol.**, v.28, n.1, p.31-35, 1995.
- SIEME, H.; KNOP, K.; RATH, D. Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5⁰C for 24h, and stored cooled for 2 or 24h and then frozen. **Anim. Reprod. Sic.**, v.94, p.99-103, 2006.
- SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B. et al. Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **The Vet. Rec.**, v.138, p.154-157, 1996.
- VERSTEGEN. J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine sêmen using egg yolk added tris-glucose extender: *In vitro* an in vivo studies. **Theriogenology**, v.64, p.720-733, 2005.
- YAMASHIRO, H.; NARITA, K.; SUGIMURA, S.; HAN, Y.; SUGAWARA, A.; MOROHAKU, K.; NAKAZATO, F.; KONNO, T.; YOSHIDA, M.; SOTO, E. Trehalose enhanced the freezability of Poodle dog sperm collected by artificial vagina. **Anim. Reprod. Sci.**, v.102, p.165-171, 2007.

4 - EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE EQUILÍBRIO, CURVAS DE CONGELAMENTO E CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL NA QUALIDADE DO SÊMEN CANINO DESCONGELADO.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação *in vitro* do efeito do tempo de equilíbrio, da taxa de congelamento e de diferentes concentrações de glicerol, sobre o sêmen canino após o seu congelamento e descongelamento em meio diluidor a base de Tris-Citrato. Para tanto, foram utilizados 12 cães, sendo 3 ejaculados coletados por indivíduo, totalizando 36 ejaculados. Após a coleta o sêmen foi centrifugado, ressuspendido em meio Tris-Citrato contendo 1, 2, 4 e 6% de glicerol e evasado em palhetas de 0,25mL. Após o envase o sêmen foi resfriado por 1 hora até 4⁰C e em seguida metade das palhetas de cada tratamento foi encaminhada para o congelamento e o restante foi mantido por mais 1 hora em equilíbrio a 4⁰C, antes do congelamento. Duas taxas de congelamento foram testadas em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido através do posicionamento das palhetas a 5 e 10 cm da superfície do nitrogênio por 10 minutos. O descongelamento foi realizado através de imersão em água a 38⁰C por 1 minuto. Em seguida o sêmen foi avaliado quanto à movimentação dos espermatozóides através de vigor, motilidade e índice espermático e quanto à integridade e viabilidade da membrana espermática pelos testes hiposmótico e de coloração supravital. A longevidade espermática foi estimada através do teste de termorresistência. Os resultados dos testes hiposmótico, de coloração supravital e de termorresistência demonstram de maneira geral melhor desempenho dos protocolos de congelamento com a presença do tempo de equilíbrio. Não foi observada influência de taxa de congelamento de forma isolada sobre os parâmetros seminais avaliados. Variações significativas só foram observadas quando se associou à variação da taxa de congelamento, variações no tempo de equilíbrio e concentração de glicerol. Isoladamente, o aumento no percentual de glicerol de 1 para 6% na composição do meio diluidor, promove melhoria pontual na integridade da membrana espermática e no índice espermático ao descongelamento. Porém, quando se associa os resultados observados dos maiores níveis de glicerol à presença do tempo de equilíbrio e à taxa lenta de congelamento, aumentos significativos são observados em todos os parâmetros estudados. Desta forma os efeitos das variações

na concentração de glicerol no meio diluidor, da presença do tempo de equilíbrio de 1 hora e de taxa rápida ou lenta de congelamento sobre os parâmetros seminais estudados podem apresentar-se isoladamente pouco significativos, porém em associação, estas variáveis apresentam efeito sinérgico, aumentando a qualidade *in vitro* do sêmen canino descongelado.

Palavras chave: criopreservação, sêmen canino, tempo de equilíbrio, taxa de congelamento, glicerol.

Abstract

The present work intends to *in vitro* evaluate the effect of the equilibrium time, the freezing rate and different glycerol concentrations, on the canine semen after freezing and thawing in Tris-Citrato extender. For that, 36 semen samples were collected, from 12 dogs, by digital manipulation. After the collection the semen was centrifuged, extended in Tris-Citrato extender added with 1, 2, 4 and 6% of glycerol and packaged in 0,25mL straws. After that the semen was cooled for 1 hour until 4°C, then half of the straws of each treatment was immediately frozen and the remainder was kept for more 1 hour in equilibrium at 4°C before the freezing. Two freezing rates had been tested in thermal box containing liquid nitrogen through the positioning of the straws 5 and 10 cm above the surface of nitrogen per 10 minutes. The thawing was carried through immersion in water 38°C per 1 minute. The semen was evaluated at the moment of collection and immediately after thawing for spermatozoa movement through motility, progressive status, and sperm index and for plasma membrane integrity and viability through hypotonic swelling tests and live/dead stain. The sperm longevity was evaluated through the thermoresistance test. The results of the hypotonic swelling test, live/dead stain and thermoresistance in the thawed semen demonstrate better performance when protocols of freezing were used with equilibrium time. Influence of the freezing rate, in isolated form, was not observed on the evaluated seminal parameters and significant variations had only been observed when equilibrium time and glycerol concentration were associated. Isolate the increase in the percentage of glycerol from 1 to 6% in the extender composition, promotes prompt improvement to plasma membrane integrity and to spermatic index in the thawed samples. However, when associated the observed results of biggest levels of glycerol to the presence of equilibrium time and to the slow rate of freezing, significant increases are observed in all the studied parameters. In this way the effect of the variations in the concentration of glycerol in the extender, in the presence of the equilibrium time and in the fast or slow freezing rate on the studied seminal parameters can be separately little significant, however in association, these variables present synergic effect, increasing the *in vitro* quality of the thawed canine semen.

Key words: cryopreservation, canine semen, equilibrium time, freezing rate, glycerol.

4.1 - Introdução

A cinofilia é nos dias atuais uma atividade que vem se modernizando e expandindo no Brasil, principalmente através da aquisição de reprodutores de qualidade superior e investimento na melhoria genética dos plantéis. As tecnologias de congelamento de sêmen têm despertado interesse entre criadores de cães por facilitarem a troca do material genético e permitirem seu armazenamento por período de tempo indeterminado (Wilson, 1993; Linde-Forsberg, 1995; Silva et al., 1996). O desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida na espécie canina desperta ainda interesse entre pesquisadores da vida selvagem uma vez que, o cão pode ser um valioso modelo para desenvolvimento de tecnologias posteriormente aplicáveis no campo de manejo e conservação de espécies de carnívoros selvagens (Gobello e Corrada, 2003; Luvoni et al., 2006).

Embora o primeiro nascimento de filhotes de cães com o uso de sêmen congelado tenha sido relatado a quase 40 anos (Seager em 1969, citado por Stefano et al., 1993), ainda hoje a taxa de concepção com o uso de sêmen canino descongelado é geralmente inferior ao observada para as demais espécies (England, 1993; Penã et al., 2006). A baixa qualidade do espermatozóide canino descongelado parece estar relacionada à sua baixa longevidade, baixa motilidade e pobre penetração no ovócito (Linde-Forsberg et al., 1999; Rota et al., 1999; Thomassen et al., 2006).

Muitos fatores influenciando a qualidade do sêmen através do processo de criopreservação são conhecidos, incluindo a composição do meio diluidor, a associação entre os crioprotetores, a taxa de resfriamento, o tempo de equilíbrio e a taxa de congelamento, bem como a associação entre taxa de congelamento e de descongelamento (Schäfer-Somi et al., 2005). A taxa de resfriamento representa a velocidade em que se resfria o sêmen da temperatura corporal ou ambiente até 4°C. Taxas muito rápidas têm sido associadas à ocorrência de danos estruturais na membrana espermática e alterações metabólicas na célula que se refletem na diminuição irreversível da motilidade espermática, sendo este fenômeno conhecido como choque frio (Watson, 2000). O tempo de equilíbrio representa uma pausa durante o protocolo de congelamento na qual o sêmen é mantido por determinado período de tempo a temperatura próxima de 4°C. Esta pausa possibilita o desenvolvimento de máxima resistência do espermatozóide aos efeitos deletérios do

cheque frio (Watson, 1979; England, 1993, Santos et al., 2003). Estudos a respeito das taxas de resfriamento e tempo de equilíbrio demonstram que em espécies como o bovino até 16 horas de equilíbrio podem ser necessárias para desenvolvimento de relativa resistência ao choque frio (Watson, 2000).

Durante o processo de congelamento, quando o sêmen atinge temperaturas inferiores a -5°C inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular o que diminui a proporção de água livre no meio e conseqüentemente aumenta a concentração osmótica de seus solutos (Hammerstedt et al., 1990, Watson, 2000). A alteração na osmolaridade do meio leva a célula a desidratar antes do congelamento total, prevenindo a formação de cristais de gelo no citoplasma e conseqüente lesões de membranas e organelas (Hammerstedt et al., 1990, Watson, 2000). Uma acentuada desidratação, entretanto, pode provocar precipitação dos solutos citoplasmáticos, distúrbios no pH e diminuição no volume celular abaixo dos valores compatíveis com a sobrevivência, sendo este fenômeno conhecido como efeito soluto (England, 1993). Desta forma, taxas de congelamento muito lentas podem levar a excessiva desidratação do espermatozóide e morte em decorrência do efeito soluto, enquanto taxas muito rápidas não possibilitam a saída suficiente de água do fluido intracelular permitindo a formação de cristais de gelo (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 2000).

Um dos primeiros crioprotetores descobertos e até hoje o mais amplamente utilizado é o glicerol. Ele age diminuindo do ponto de congelamento das soluções e desta forma prevenindo a formação de cristais de gelo intracelulares e atenuando o efeito solução (Amann e Pickett, 1987; Santos et al., 2003; Holt, 2000). Embora o glicerol mostre-se extremamente eficiente como crioprotetor, ele apresenta efeito tóxico sobre o espermatozóide em determinadas concentrações e temperaturas, no entanto, a toxicidade do glicerol varia significativamente entre as diferentes espécies (Fahy, 1986; England, 1993; Holt, 2000; Santos et al., 2003; Pesch e Bergmann, 2006). A maioria dos estudos realizados em cães utilizaram meios diluidores contendo 4% de glicerol, mas este crioprotetor vem sendo testado em concentrações que variam de 1 a 16%, na busca de um perfeito ajuste entre seus efeitos crioprotetores e tóxicos (Peña et al., 1998; Santos et al., 2003).

Apesar do crescente interesse em reprodução assistida na espécie canina, até o momento não foi possível determinar um protocolo definitivo para congelado de sêmen nesta espécie. Ainda hoje poucos são os trabalhos publicados na área de

criopreservação de sêmen de cão, em parte devido ao alto custo de manutenção de grandes colônias experimentais e também ao fato de que as agências comerciais de congelamento de sêmen na maioria das vezes não divulgam de forma confiável seus resultados ou metodologias (Linde-Forsberg, 2001; Nizanski, 2006; Thomassen et al., 2006). Os dados apresentados na literatura tornam-se especialmente escassos se considerarmos que, a grande variedade de metodologias empregadas pelas diferentes equipes de pesquisadores dificulta a comparação de resultados entre trabalhos (Eilts, 2005). Ainda, em alguns trabalhos, o pequeno número de animais utilizados associado à grande variação de raças torna os resultados apresentados pouco significativos (Linde-Forsberg, 2001; Eilts, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação *in vitro*, do efeito do tempo de equilíbrio, da taxa de congelamento e de diferentes concentrações de glicerol, sobre o sêmen canino após o seu congelamento e descongelamento em meio diluidor a base de Tris-Citrato.

4.2 - Materiais e Métodos

Foram utilizados 12 cães machos adultos, clinicamente sadios. Antes do início do trabalho os cães passaram por completo exame clínico e andrológico, sendo selecionados para o experimento aquele que apresentassem os parâmetros físicos e morfológicos seminais julgados dentro dos padrões considerados normais para a espécie (CBRA, 1998).

O sêmen foi coletado, em alíquota única, contendo a fração espermática, pelo método de manipulação digital, em tubos de centrifuga graduados acoplados a um funil de plástico, sendo o conjunto aquecido antes da coleta e o tubo de centrifuga mantido dentro de recipiente contendo água a 38°C. Foram realizadas três coletas em cada animal, totalizando 36 coletas.

Imediatamente após a coleta o sêmen foi mantido em banho-maria a 38°C enquanto uma alíquota de 20µL foi posta em lâmina previamente aquecida e coberta com lamínula para avaliação do vigor (intensidade de movimento classificada de 0 a 5) e motilidade espermática (porcentagem de espermatozóides móveis classificada de 0 a 100%) em aumento de 100 e 400x. Posteriormente estes valores foram utilizados para confecção do índice espermático (IE) através da fórmula: $IE = [M + (V \times 20)]/2$, onde M = motilidade espermático e V = vigor espermático (Morais et al., 2002).

A mensuração da concentração espermática foi feita em câmara hematimétrica por meio da diluição de 20 μL de sêmen em 1 mL de formol salina tamponada e contagem das células presentes dentro do espaço da câmara, sendo a concentração determinada com base no fator de diluição. O número total de espermatozoides por ejaculado foi obtido multiplicando-se a concentração espermática pelo volume total coletado. Em seguida o sêmen foi centrifugado a 300g por dez minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* formado ressuspensionado em meio diluidor base Tris-citrato (Schäfer-Somi et al., 2005, Anexo 1) sem adição de glicerol de forma a atingir a concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL. O sêmen ressuspensionado foi dividido em 4 alíquotas iguais e rediluído na proporção de 1:1 em meio diluidor base, adicionado de 2, 4, 8 e 12% de glicerol de forma a obter-se soluções finais com 1, 2, 4 e 6% de glicerol e uma concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL. Estas 4 alíquotas foram envasadas em palhetas de 0,25 mL, sendo que pelo menos 4 palhetas foram preenchidas para cada tratamento.

Após o envase, as palhetas foram acondicionadas em tubos de ensaio com tampa, pré-aquecidos. Os tubos de ensaio foram posicionados dentro de um recipiente de vidro contendo 650 mL de água a 38°C. O recipiente de vidro por sua vez foi fechado hermeticamente e submergido em 7L de água+gelo contidos dentro de caixa de isopor. Os volumes, tanto de água a 38°C quanto de gelo foram previamente ajustados de forma que a curva de resfriamento resultante atinge 4°C em um período de 1 hora (0,57°C/min). Após o resfriamento metade das palhetas de cada tratamento foi encaminhada para o congelamento e o restante foi mantido na caixa de isopor por mais 1 hora em equilíbrio a 4°C, antes do congelamento.

Duas taxas de congelamento foram testadas em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido, uma lenta (7°C/min), na qual as palhetas foram posicionadas a 10 cm da superfície do nitrogênio e uma rápida (11°C/min), onde as palhetas foram mantidas a 5 cm, ambas por 10 minutos. Assim, cada concentração de glicerol testada foi submetida a resfriamento com e sem tempo de equilíbrio de uma hora e congelada em uma taxa rápida e uma taxa lenta.

Passados uma semana as palhetas foram descongeladas através de imersão em água a 38°C por um minuto. Em seguida o sêmen foi transferido para frascos tipo *ependorf* de 1,5ml mantidos incubados em banho-maria a 38°C. Posteriormente foram analisados o vigor e motilidade espermática como descrito para o sêmen a fresco e também conduzido teste hiposmótico e teste de coloração supravital. O teste

hiposmótico baseia-se na reação de enrolamento da cauda do espermatozóide. Isto é observado quando um espermatozóide com membrana citoplasmática funcional é exposto a um meio hiposmótico. Desta forma para realização deste teste uma amostra de 20 µL de sêmen foi incubada a 38°C por meia hora em 0,5 mL de solução de frutose e citrato de sódio a 60 mosmol (Rota et al., 2006). Em seguida 100 células foram observadas em microscopia ótica com 400 vezes de aumento para contabilização do percentual bruto de espermatozóides com cauda enrolada ou reativos ao teste hiposmótico (HO^B). Dentro deste total bruto um parcela dos espermatozóides já apresentavam cauda enrolada mesmo antes do teste hiposmótico, assim, o valor bruto de espermatozóides com cauda enrolada foi corrigido excluindo-se da população total a parcela com caudas enrolada contabilizada antes do teste hiposmótico (ENR). Para isto uma alíquota de 20 µL do sêmen descongelado foi adicionada a 0,5 mL de formol salina tamponada e avaliada ao microscópio de luz quanto à proporção especificamente de caudas enroladas. Desta forma o percentual corrigido de células reativas ao teste hiposmótico foi calculado no presente trabalho através da formula: $HO^C = (HO^B - ENR) / (100 - ENR)$. Os valores foram apresentados na forma de porcentagem.

Para o teste de coloração supravital 20 µL de sêmen foram adicionados a 40µL de corante eosina-nigrosina previamente aquecidos por 40 segundos. Em seguida foi confeccionado um esfregaço em lâmina e imediatamente seco ao ar e observado em aumento de 400x para contabilização dos espermatozóides corados, sendo estes computados como lesionados.

A longevidade espermática foi estimada através do teste de termorresistência. Para tanto o sêmen foi incubado em banho-maria a 38°C por 2 horas sendo que neste período seu vigor e motilidade foram avaliados em intervalos de 15 minutos. Os dados de vigor e motilidade obtidos durante o teste de termorresistência são apresentados na forma de índice espermático.

Os dados avaliados foram descritos quanto à média e respectivo desvio padrão. Para a comparação das médias foi calculado o intervalo médio de confiança com margem de 5% de erro através da função estatística do programa Excel Windows XP.

4.3 - Resultados e Discussão

No presente trabalho os resultados dos testes hiposmótico e de coloração supravital, que avaliam a integridade e viabilidade da membrana espermática, demonstram de maneira geral, embora estatisticamente não significativa, melhor desempenho dos protocolos de resfriamento com a presença do tempo de equilíbrio (Tabelas 1 e 2). Bouchard et al. (1990) estudando o resfriamento de sêmen afirmaram que os espermatozóides de cão seriam mais resistentes a uma desestabilização da membrana espermática que as demais espécies. Esta desestabilização é um fenômeno naturalmente observado durante o resfriamento de células e pode levar a uma perda irreversível da motilidade espermática, sendo conhecido como choque frio. Watson (2000) cita que, durante o processo de congelamento, a presença de um tempo de equilíbrio a temperaturas próximas a 4°C é benéfica, uma vez que esta pausa permite a ocorrência de mudanças estruturais na membrana espermática que a tornam mais resistente ao choque frio. Santos et al. (2003) avaliando protocolos de congelamento de sêmen de cão com intervalos variados de tempo de equilíbrio, observaram que o tempo de uma hora oferece os melhores resultados. Assim, baseado nos resultados do presente trabalho a presença de um tempo de equilíbrio de uma hora parece ser necessário para que o espermatozóide canino apresente melhor integridade e viabilidade da membrana espermática após seu descongelamento.

O teste de termorresistência avalia a longevidade espermática e é tido como um bom preditor da fertilidade em várias espécies (England, 1993). O sêmen canino tem a característica particular de baixo desempenho no teste de termorresistência quando comparado ao de outras espécies. Esta característica, entretanto, não é necessariamente associada à baixa fertilidade visto que em alguns estudos, amostras de sêmen com relativo baixo desempenho no teste de termorresistência apresentaram taxas de fertilidade normais (Cardoso et al., 2005). Na tabela 3 são apresentadas as médias de índice espermático durante o teste de termorresistência nos diferentes tratamentos. Observa-se que nos tratamentos com a presença do tempo de equilíbrio de 1 hora, os valores médios apresentam-se superiores àqueles sem o tempo de equilíbrio, com exceção do tratamento que utiliza meio com 2% de glicerol e congelamento em taxa rápida. Ainda, a superioridade das médias de índice espermático, em alguns tratamentos com presença de tempo de equilíbrio, é estatisticamente significativa, especialmente naqueles que utilizam maiores

concentrações de glicerol (Tabela 3). Da mesma forma, Santos et al. (2003) avaliando o efeito de diferentes tempos de resfriamento para congelamento de sêmen de cão observaram melhores desempenhos no teste de termorresistência nos tratamentos com 1 e 2 horas de equilíbrio.

Tabela 1 – Porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico nos diferentes protocolos.

Tempo de equilíbrio	Meio com 1% de glicerol	Meio com 2% de glicerol	Meio com 4% de glicerol	Meio com 6% de glicerol
Congelamento a 5 cm do vapor de nitrogênio				
Ausente	9,01±11,98 ^a	13,75±12,73 ^{ab}	20,05±18,11 ^b	23,06±18,24 ^b
Presente	12,39±11,43 ^{ab}	16,51±12,42 ^{ab}	23,35±15,56 ^b	24,68±22,24 ^b
Congelamento a 10 cm do vapor de nitrogênio				
Ausente	14,09±13,74 ^{ab}	14,09±13,74 ^{ab}	14,09±13,74 ^{ab}	14,09±13,74 ^{ab}
Presente	18,61±14,90 ^b	18,61±14,90 ^b	18,61±14,90 ^b	18,61±14,90 ^b

Dados apresentados em Média ± Desvio Padrão.

Letras diferentes representam médias significativamente diferentes (p<0,05).

A taxa de congelamento representa a velocidade em que o sêmen é congelado a partir da temperatura final do processo de resfriamento. Com a utilização de um aparelho congelador biológico é possível programar diferentes taxas de congelamento para diferentes intervalos de temperatura. Embora com menor eficiência é possível o estabelecimento de diferentes curvas de congelamento através do posicionamento do sêmen envasado a diferentes distâncias da superfície do nitrogênio líquido. Taxas de congelamento têm sido descritas entre -10 e -100°C/min, na busca de uma perfeita interação com: os componentes do meio, a taxa de resfriamento e o tempo de equilíbrio (England 1993). No presente trabalho, avaliando-se isoladamente a taxa de congelamento, não foi observada diferença significativa sobre a integridade e viabilidade de membranas espermática e o índice espermático após o descongelamento (Tabelas 1, 2 e 3). Variações estatisticamente significativas só são observadas quando se associa à variação da taxa de congelamento, variações no tempo de equilíbrio e concentração de glicerol (Tabela 1, 2 e 3). Foot (1964) utilizando um aparelho de congelamento biológico comparou diversas curvas de congelamento em diferentes etapas do processo e constatou que curvas mais lentas foram superiores àquelas mais rápidas, já Olar et al. (1984) concluiu que curvas intermediárias foram superiores às demais estudadas. Smith (1984) comparou 4 protocolos de congelamento de sêmen canino em caixa de isopor,

nos quais o congelamento era feito a 3,8; 10,2 e 20,3 cm da lâmina de nitrogênio líquido e constatou que a altura de 20,3 cm seria a ideal. Também Dobrinski et al. (1993) apontam a distância de 20 cm como ideal para congelamento de sêmen em diferentes meios diluidores. Nothing e Shuttleworth (2005) avaliaram duas taxas de congelamento para sêmen canino posicionando as palhetas a 3.5 e 8 cm da lâmina de nitrogênio e concluíram que melhor protocolo foi o que utilizou a taxa lenta de congelamento. Rota et al. (1998), utilizando um aparelho congelador biológico, avaliaram duas taxas de congelamento de sêmen canino e não encontraram diferença entre a taxa lenta e rápida. Uma taxa de congelamento ideal deve balancear os efeitos negativos e positivos da formação de cristais de gelo e da desidratação celular no intuito de obter máxima sobrevivência de espermatozóides ao descongelamento, entretanto, como observado no presente trabalho, estes fenômenos são altamente influenciados por outras variáveis, especialmente o tempo de equilíbrio (Watson, 2000) e a concentração de glicerol (England 1993; Peña et al, 1998).

Tabela 2 – Porcentagem de espermatozóides corados pela coloração de eoina-nigrosina nos diferentes protocolos.

Tempo de equilíbrio	Meio com 1% de glicerol	Meio com 2% de Glicerol	Meio com 4% de glicerol	Meio com 6% de glicerol
Congelamento a 5 cm do vapor de nitrogênio				
Ausente	83,61±17,92 ^a	85,91±9,08 ^{ab}	86,47±6,45 ^{ab}	86,53±6,97 ^{ab}
Presente	84,91±9,82 ^{ab}	79,09±16,26 ^{ab}	76,65±11,44 ^{ab}	76,56±12,53 ^{ab}
Congelamento a 10 cm do vapor de nitrogênio				
Ausente	84,18±9,17 ^{ab}	81,25±8,82 ^{ab}	80,67±11,08 ^{ab}	79,42±10,42 ^{ab}
Presente	78,53±10,97 ^{ab}	71,10±14,05 ^b	69,27±14,65 ^b	64,47±13,85 ^b

Dados apresentados em Média ± Desvio Padrão.

Letras diferentes representam médias significativamente diferentes (p<0,05).

É bem estabelecido que o glicerol apresenta efeitos tóxicos sobre o espermatozóide dependendo da espécie, concentração utilizada e temperatura de adição (Fahy, 1986; England, 1993; Holt, 2000; Santos et al., 2003; Pesch e Bergmann, 2006). Estes efeitos parecem estar associados a alterações da viscosidade do citoplasma que possivelmente inibem processos metabólicos que envolvam difusão de solutos (Holt, 2000). Para Hammerstedt et al. (1978) a variação na toxicidade do glicerol entre as diferentes espécies pode ser atribuída a diferentes

graus de influência do glicerol sobre a viscosidade natural do citoplasma. No presente trabalho, em análise isolada, o aumento no percentual de glicerol de 1 para 4 e 6% na composição do meio diluidor, promove melhoria significativa na integridade da membrana espermática (Tabela 1) e no índice espermático ao descongelamento (Tabela 3). Porém, quando se associa os resultados observados dos maiores níveis de glicerol à presença do tempo de equilíbrio e à taxa lenta de congelamento, aumentos significativos são observados em todos os parâmetros estudados (Tabela 1, 2 e 3).

Weiss et al. (2000) avaliando o congelamento de sêmen canino em meios contendo 5 e 6 % de glicerol verificaram melhor motilidade progressiva e integridade acrossomal nas amostras com 6% de glicerol. Peña et al. (1998) avaliando o congelamento de sêmen em meio Tris-Citrato contendo 2, 4, 6 e 8% de glicerol relataram melhores resultados com meio contendo 8 % de glicerol. Santos et al. (2003) avaliando a qualidade do sêmen canino congelado em meio Tris-Citrato contendo 4, 6, 8 e 10% de glicerol também concluíram que as amostras congeladas com meio contendo 8% de glicerol apresentaram melhores resultados. Entretanto Rota et al. (1998) avaliaram o congelamento do sêmen canino, com duas taxas de congelamento e duas taxas de descongelamento, em meio contendo 3 e 5% de glicerol. Os autores verificaram melhor qualidade do sêmen descongelado rapidamente em meio contendo 5 % de glicerol, não sendo observada influência da taxa de congelamento sobre a motilidade espermática e integridade de membrana espermática. No presente trabalho, os melhores resultados *in vitro* foram observados quando associam-se às mais altas concentrações de glicerol à taxa lenta de congelamento. A curva que representa a sobrevivência dos espermatozóides em relação à taxa de congelamento é sigmóide com a extensão do platô variando conforme o protocolo de congelamento (England, 1993). Desta forma é possível que o espermatozóide canino seja resistente apenas a uma pequena amplitude de taxas de congelamento, tempos de equilíbrio e concentrações de glicerol, justificando assim a dificuldade em se estabelecer consenso no protocolo ideal para a espécie (Peña et al, 1998).

Tabela 3 – Índice espermático ao descongelamento (T⁰) e 15 (T¹), 30 (T²), 45 (T³) e minutos após o nos diferentes protocolos.

	Tempo de equilíbrio	Meio com 1% de glicerol	Meio com 2% de glicerol	Meio com 4% de glicerol	Meio com 6% de glicerol
Congelamento a 5 cm do vapor de nitrogênio					
T ⁰	Ausente	24,20±17,37 ^a	40,05±15,41 ^{bc}	43,70±14,51 ^{bc}	35,52±17,93 ^{ab}
	Presente	30,61±16,09 ^{ab}	36,86±16,70 ^b	47,74±16,56 ^{bc}	39,69±15,86 ^{bc}
Congelamento a 10 cm do vapor de nitrogênio					
T ⁰	Ausente	30,64±20,24 ^{ab}	35,82±18,28 ^{ab}	37,72±17,95 ^{bc}	37,92±15,52 ^{bc}
	Presente	35,75±18,42 ^{ab}	40,23±17,72 ^{bc}	41,97±23,69 ^{bc}	49,77±15,55 ^c
Congelamento a 5 cm do vapor de nitrogênio					
T ¹	Ausente	9,64±13,57 ^a	20,52±16,27 ^{bc}	19,30±14,28 ^b	14,91±14,32 ^{ab}
	Presente	16,94±15,48 ^{ab}	23,75±16,29 ^{bc}	30,68±16,43 ^c	19,25±14,08 ^{bc}
Congelamento a 10 cm do vapor de nitrogênio					
T ¹	Ausente	17,53±16,03 ^{ab}	20,21±16,02 ^{bc}	19,44±16,53 ^{ab}	17,84±15,22 ^{ab}
	Presente	23,72±18,27 ^{bc}	26,56±18,49 ^{bc}	29,11±21,62 ^{bc}	31,83±17,51 ^c
Congelamento a 5 cm do vapor de nitrogênio					
T ²	Ausente	4,28±9,45 ^a	7,45±13,65 ^{ab}	5,47±11,02 ^a	6,41±11,88 ^{ab}
	Presente	9,26±13,90 ^{ab}	11,77±15,56 ^{ab}	18,73±16,97 ^b	10,66±14,64 ^{ab}
Congelamento a 10 cm do vapor de nitrogênio					
T ²	Ausente	9,20±13,96 ^{ab}	8,58±13,96 ^{ab}	8,27±13,14 ^{ab}	7,89±12,34 ^{ab}
	Presente	16,17±15,72 ^b	14,94±16,11 ^b	25,89±40,42 ^b	20,55±15,87 ^b
Congelamento a 5 cm do vapor de nitrogênio					
T ³	Ausente	1,92±6,48 ^{ab}	2,59±8,30 ^{ab}	1,09±6,09 ^a	1,42±5,84 ^{ab}
	Presente	3,14±8,91 ^{ab}	6,80±13,33 ^{ab}	8,00±12,63 ^b	5,67±11,72 ^{ab}
Congelamento a 10 cm do vapor de nitrogênio					
T ³	Ausente	3,14±9,77 ^{ab}	2,45±8,60 ^{ab}	3,35±9,31 ^{ab}	2,52±8,04 ^{ab}
	Presente	8,28±12,83 ^b	10,79±14,13 ^b	11,20±15,98 ^b	11,41±14,98 ^b

Dados apresentados em Média ± Desvio Padrão.

Letras diferentes a cada duas linhas representam médias significativamente diferentes (p<0,05).

4.4 - Conclusão

Os efeitos das variações na concentração de glicerol no meio diluidor, da presença do tempo de equilíbrio e de taxa rápida ou lenta de congelamento sobre a integridade e viabilidade da membrana espermática e sobre o índice espermático, podem apresentar-se isoladamente pouco significativos, porém em associação, estas variáveis apresentam efeito sinérgico, aumentando a qualidade *in vitro* do sêmen canino descongelado. O protocolo de congelamento que associa o meio diluidor com 6% de glicerol, o tempo de resfriamento de 1 hora e a taxa lenta de congelamento apresentou melhor desempenho na avaliação *in vitro* dos parâmetros de motilidade e longevidade espermática e viabilidade e integridade de membrana plasmática.

4.5 – Referências Bibliográficas

AMANN, R. P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Sci** , v.7, p.145-173, 1987.

BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R.S. Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v.34, n.1, p.147-157, 1990.

CARDOSO, R. C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. **Ver. Bras. Reprod. Anim.**, v.29, n.314, p.179-187, 2005.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal** (2ed), Belo Horizonte, CBRA, 49p, 1998.

DOBRINSKI, I.; LULAI, C.; BARTH, A.D.; POST, K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.291-296, 1993

- EILTS, B.E. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. **Theriogenology**, v.64, p.685-691, 2005.
- ENGLAND, G.C. Criopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fertil. Suppl**, v.47, p.234-255, 1993.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13,1986.
- FOOTE, R.H.; Extenders for freezing dog semen. **Ame. J. Vet. Resea.**, n.25, p.370-390, 1964.
- GOBELLO, C.; CORRADA, Y. Biotecnology in canine reproduction: an update. **Acta Veterinaria**, v.23, n.1, p.30-37, 2003.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Andrology**, v.11, n.1, p.73-87, 1990.
- HAMMERSTEDT, R.H.; KEITH, A.D.; SNIPES, W. AMAN, R.P.; ARRUDA, D.; GRIEL, L.J. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolarity and osmolality on sperm. **Biol. Reprod.**, v.18, p.686, 696, 1978.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Scie.**, v.62, p.3-22, 2000.
- LINDE-FORSBERG,C. Intra-uterine insemination in the dog using the Scandinavian trans-cervical catheter and a comparison with other methods. **Recent Advances in Small Animall Reproduction**. Ithaca, New York, 2001. Disponibilidade e acesso: <<http://www.ivis.org>>. Acessado em 21 de agosto de 2007.

LINDE-FORSBERG,C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. **Sem. Vet. Med and Surg. (Small Animal)**, v.10, n.1, p.48-58, 1995.

LINDE-FORSBERG, C.; STROM HOLST, B.; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. **Theriogenology**, v.52, p.11-23, 1999.

LUVONI. G.C.; CHIGIONI,S.; BECCAGLIA, M. Embryo production in dogs: from *in vitro* fertilization to cloning. **Reprod. Dom. Anim.**, v.14, p.286-290, 2006.

MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, 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 oncelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.2027-2041, 2002.

NIZANSKI, W. Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: use of an infusion pipett and the Osiris catheter. **Theriogenology**, v.66, p.470-483, 2006.

NÖTHLING, J.O.; SHUTTLEWORTH, R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. **Theriogenology**, v.63, p.1469-1480, 2005.

OLAR, T.T. Criopreservation of dog spermatozoa. Colorado, 1984. Tese de Pós-Doutorado – Colorado State University.

PEÑA, F.J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J.M. Sêmen technologies in dog breeding: an update. **Reprod. Dom. Anim.**, Supp. 12, v.41, p.21-29, 2006.

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

PESCH, S.; BERGMENN, M.; Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p.597-612, 2006.

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparison between glycerol and ethyleneglycol for dog semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1848-1858, 2006.

ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. et al. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. **Theriogenology**, v.51, p.1045-1058, 1999.

ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J.; ROMAGNOLI, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations na freezing/thawing rates. **Reprod. Dom. Anim.**, v.33, p.355-361, 1998.

SANTOS, I.W.; LIMA, V.F.M.H.; NISFELD, L.C.; RIBEIRO, A.P.C. Congelamento do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio. **Arch. Vet. Sci.**, v.8, n.2, p.57-62, 2003.

SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E.; KLEIN, D.; AURICH, C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, n2, p.173-182, 2005.

- SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B. et al. Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **The Vet. Rec.**, v.138, p.154-157, 1996.
- SIMITH, F.O. and GRAHAM, E.F. Cryopreservation of canine semen, techniques and performance. **10^o International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, Urbana-Champaign, v.2, p.216, 1984.
- STEFANO, B.; ZAMBELLIN D.; BERGONZONI, M.L. L'inseminazione artificiale nel cane con seme congelato. **Praxis Vet.** v.14, n.2, p.12-18, 1994
- THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, J.A.; ANDERSEN BERG, K.; FARSTAD, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. **Theriogenology**, v.66, p.1645-1650, 2006.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p.481-492, 2000.
- WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v.1, p. 283-350, 1979.
- WEISS, R.R.; RODASKI, S.; BÜCHELE, J.M.; SANTOS, I.W.; ALMEIDA, L.M. Estudo preliminar de algumas características do sêmen canino congelado. **Arch. Vet. Sci.**, v. 5, p.67-71, 2000.
- WILSON. M.S. Non-sirurgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **J Rep. Fert. Suppl.**, v.47, p.307-311, 1993.

5 - INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO INDIVIDUAL E RACIAL NA QUALIDADE DO SÊMEN CANINO CONGELADO EM MEIO TRIS-CITRATO ACRESCIDO DE 6 % DE GLICEROL.

Resumo

O presente trabalho visa relatar a diferença individual e racial encontrada na congelabilidade do sêmen canino, bem como analisar a correlação dos parâmetros de avaliação *in vitro* do sêmen antes e depois do congelamento. Para tanto, 36 ejaculados foram coletados de 12 cães das raças Beagle (n=3), Schnauzer (n=3), Doberman (m=3) e Boxer (N=3), pelo método de manipulação digital e congelados em meio Tris-Citrato contendo 6% de glicerol. O sêmen foi avaliado, antes e após o congelamento, quanto à movimentação dos espermatozóides através de vigor, motilidade e índice espermático e quanto à integridade e viabilidade da membrana espermática pelos testes hiposmótico e de coloração supravital. A longevidade espermática foi estimada no sêmen descongelado através do teste de termorresistência. Variação individual foi observada no índice espermático no sêmen descongelado, mas não no sêmen fresco. Já os parâmetros de integridade e viabilidade da membrana espermática apresentaram variação individual em ambos. Quando se avalia a variável raça não se observa alterações significativas quanto aos parâmetros avaliados no sêmen fresco, porém no sêmen descongelado, observaram-se variações significativas na integridade e viabilidade da membrana espermática. Os cães da raça Schnauzer apresentaram significativamente menor longevidade espermática após o descongelamento. As raças Doberman e Boxer apresentaram os melhores resultados de congelabilidade na avaliação *in vitro*. A exceção do teste de coloração supravital, os parâmetros estudados apresentaram correlações significativas entre os dados coletados no sêmen fresco com aqueles observados no sêmen descongelado.

Palavras chave: sêmen canino, congelabilidade individual e racial, avaliação *in vitro*.

Abstract

The present work aims to describe the individual and the breed influences in the freezability of the canine semen, as well as analyze the correlation of the *in vitro* parameters of the semen quality before and after freezing. In present work 36 semen samples were collected, from 12 dogs of the: Beagle (n=3), Schnauzer (n=3), Doberman (n=3) and Boxer (n=3) breeds, by digital manipulation and frozen in Tris-Citrate extender added with 6% of glycerol. The semen was evaluated at the moment of the collection and immediately after thawing for spermatozoa movement through motility, progressive status, and sperm index and for plasma membrane integrity and viability through osmotic swelling tests and live/dead stain. The sperm longevity was evaluated through the thermoresistance test. Individual variation was observed in spermatic index of thawed semen, but not in the fresh semen. Already the parameters of plasma membrane integrity and viability had presented individual variation in both. When the parameter breeds is evaluated, any significant alterations were observed on the parameters evaluated in the fresh semen, however in the thawed semen, significant variations in the plasma membrane integrity and viability had been observed. The dogs of the Schnauzer breed had presented significantly shorter sperm longevity after the thawing. The Doberman and Boxer breeds had presented the best results of freezability in *in vitro* evaluation. With the exception of the test of live/dead stain, the studied parameters had presented significant correlations between the data collected in the fresh semen with those observed in the thawed semen.

Key words: canine semen, individual and breed freezability, *in vitro* evaluation.

5.1 - Introdução

Nas últimas décadas têm-se observado no Brasil, entre criadores de cães especializados, grande investimento na aquisição de reprodutores de qualidade superior. Em seu último relatório anual a Confederação Brasileira de Kennels Clubs (CBKC) informa a importação de 483 matrizes e reprodutores (CBKC, 2005). Ainda, o aperfeiçoamento e difusão das tecnologias de congelamento de sêmen e inseminação artificial, especialmente na Europa e Estados Unidos, têm ampliado as perspectivas de importação de material genético para fins de melhoramento dos plantéis (Linde-Forsberg, 1995; Silva et al., 1996).

Análises evolutivas baseadas na comparação do DNA mitocondrial sugerem que o cão divergiu do lobo (*Canis lupus*) a mais de 15.000 anos (Schelleng et al, 2005). Desde então, uma intensa seleção, especialmente nos últimos 300 anos resultou na criação de mais de 400 raças, sendo o cão a espécie doméstica que apresenta maior variabilidade morfológica (Schelleng et al, 2005; Mascarenhas et al, 2006). As raças caninas foram em sua maioria desenvolvidas a partir de seleção genética extremamente endogâmica, em função exclusivamente de parâmetros estético, habilidade de trabalho e comportamento (Leppänen et al, 2000). Leroy et al., (2006) estudaram, através da análise dos dados de pedigree, a variabilidade genética de populações de indivíduos de nove raças caninas nascidos entre 1997 e 2001 e demonstraram que a variabilidade genética destas populações tem diminuído marcadamente nos últimos anos, sendo que em algumas raças, a taxa de diminuição chega a comprometer a manutenção futura da população. O coeficiente médio de consangüinidade em todas as raças estudadas por Leroy et al (2006) foi próximo a 3,125 %, valor correspondente ao cruzamento de animais com pelo menos um avô em comum. Na maioria das raças estudadas por Leroy et al, (2006), foi observada uma grande proporção de indivíduos apresentando coeficiente de consangüinidade superior a 6,25%, correspondente ao acasalamento de animais com pelo menos dois avôs em comum. Como conseqüência dos altos níveis de consangüinidade, atualmente muitas raças caninas tem de lidar com doenças geneticamente herdadas, sendo que mais de 400 destas doenças já são descritas (Patterson, 1993). Assim, patologias caninas, como a displasia coxofemoral, tornando-se ao longo do tempo características em raças como Retriever do Labrador , São Bernardo e Rottweiler. Leppänen et al. (2000) estudando a herdabilidade da displasia coxofemoral

afirmaram que, embora esta patologia apresente herdabilidade média, o tipo de seleção genética utilizada entre criadores de cães, baseada unicamente em parâmetros morfológicos, tem dificultado o controle da doença uma vez que possibilita o acasalamento de animais com boas características fenotípicas mas pobre genótipo. Da mesma forma, esta seleção genética tem possibilitado o extensivo cruzamento de animais com baixo potencial genotípico em relação a características reprodutivas. Altas incidências de deficiência reprodutivas geneticamente herdadas como cistos ovarianos, baixa habilidade materna e criptorquidismo são particularmente observadas em algumas raças e famílias de cães. Esta seleção arbitrária de características reprodutivas tem sido possível em parte devido ao fato de que, na maioria das criações de cães, utiliza-se sistema de monta natural, onde os reprodutores são pouco exigidos, uma vez que a proporção macho : fêmea é baixa e permite diversos cruzamentos a cada ciclo estral (Rijsselaere et al., 2005). Um dos grandes problemas enfrentados atualmente pelos profissionais que trabalham com reprodução na espécie canina é o fato de que, com o crescente desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida, em especial a criopreservação de sêmen, muitos cães até então considerados bons reprodutores em sistema de monta natural passam a não se adequar. No entanto, algumas vezes, o valor comercial associado a certos animais, bem como sua importância como reprodutor em relação ao melhoramento da raça, torna impraticável a exclusão destes animais dos programas de reprodução.

Variações individuais na congelabilidade do sêmen, definida como habilidade dos espermatozoides de sobreviver ao congelamento, são encontradas em várias espécies, inclusive no cão (England, 1993 ; Batista et al., 2006). Alguns autores atribuem estas variações a diferenças na composição lipídica da membrana espermática e na sensibilidade do espermatozoide aos efeitos tóxicos do glicerol (Hammerstedt et al., 1978; Cross, 1998, Watson, 2000). A toxicidade do glicerol parece estar associada a alterações da viscosidade do citoplasma que, possivelmente, inibem processos metabólicos que envolvam difusão de solutos (Holt, 2000). Hammerstedt et al. (1978) apontam que variações na toxicidade do glicerol pode ser atribuída a diferentes graus de influência deste sobre a viscosidade natural do citoplasma. Ainda, a proporção de colesterol e ácido graxo saturado presente na membrana espermática, determina uma maior ou menor tendência a sofrer, quando exposta a baixas temperaturas, mudanças conformacionais que podem levar a

alteração da permeabilidade da membrana e queda da motilidade espermática (Amann e Pickett, 1987; Hammerstedt et al., 1990; Holt, 2000).

A avaliação *in vitro* do sêmen fresco pode, dependendo da situação, visar diferentes objetivos. Durante a avaliação andrológica de um reprodutor ou durante uma inseminação artificial, o propósito da avaliação *in vitro* do sêmen é estimar a fertilidade da amostra (Eilts, 2005). Neste sentido parâmetros como movimentação espermática, integridade de membrana e normalidade morfológica tem sido correlacionados com a fertilidade em diversos trabalhos (Smith et al., 1977; Oettlé, 1993, Neild et al., 2000; Peña Martinez, 2004; Thomassen et al., 2006). Entretanto, quando a avaliação busca determinar a congelabilidade individual da amostra, baixas correlações têm sido observadas entre a avaliação *in vitro* do sêmen antes e depois do congelamento (Nöthling et al., 1997; Batista et al., 2006).

Desta forma o presente trabalho visa avaliar a diferença individual e racial encontrada na congelabilidade do sêmen canino, bem como analisar a correlação dos parâmetros de avaliação *in vitro* do sêmen antes e depois o congelamento.

5.2 - Materiais e Métodos

Foram utilizados 12 cães machos adultos, clinicamente sadios, das raça Beagle (n=3), Schnauzer (n=3), Boxer (n=3) e Doberman (n=3). Os animais pertenciam a canis especializados na criação das respectivas raças sendo todos reprodutores com histórico prévio de fertilidade. Antes do início do trabalho os cães passaram por completo exame clínico e andrológico, sendo selecionados para o experimento aquele que apresentassem os parâmetros físicos e morfológicos seminais julgados dentro dos padrões considerados normais para a espécie (CBRA, 1998).

O sêmen foi coletado, em alíquota única, contendo a fração espermática, pelo método de manipulação digital, em tubos de centrifuga graduados acoplados a um funil de plástico, sendo o conjunto aquecido antes da coleta e o tubo de centrífuga mantido dentro de recipiente contendo água a 38°C. Foram realizadas três coletas em cada animal, totalizando 36 coletas.

Imediatamente após a coleta o sêmen foi mantido em banho-maria a 38°C enquanto uma alíquota de 20µL foi posta em lâmina previamente aquecida e coberta com lamínula para avaliação do vigor (intensidade de movimento classificada de 0 a

5) e motilidade espermática (porcentagem de espermatozóides móveis classificada de 0 a 100%) em aumento de 100 e 400x. Posteriormente estes valores foram utilizados para confecção do índice espermático (IE) através da fórmula: $IE = [M + (V \times 20)]/2$, onde M = motilidade espermática e V = vigor espermático (Morais et al., 2002).

A integridade da membrana espermática foi avaliada através dos testes hiposmótico e de coloração supravital. O teste hiposmótico baseia-se na reação de enrolamento da cauda do espermatozóide. Isto é observado quando um espermatozóide com membrana citoplasmática funcional é exposto a um meio hiposmótico. Desta forma para realização deste teste uma amostra de 20 μ L de sêmen foi incubada a 38°C por meia hora em 0,5 mL de solução de frutose e citrato de sódio a 60 mosmol (Rota et al., 2006). Em seguida 100 células foram observadas em microscopia ótica com 400 vezes de aumento para contabilização do percentual bruto de espermatozóides com cauda enrolada ou reativos ao teste hiposmótico (HO^B). Dentro deste total bruto um parcela dos espermatozóides já apresentavam cauda enrolada mesmo antes do teste hiposmótico, assim, o valor bruto de espermatozóides com cauda enrolada foi corrigido excluindo-se da população total a parcela com caudas enrolada contabilizada antes do teste hiposmótico (ENR). Para isto uma alíquota de 20 μ L do sêmen foi adicionada a 0,5 mL de formol salina tamponada e avaliada ao microscópio de luz quanto à proporção especificamente de caudas enroladas. Desta forma o percentual corrigido de células reativas ao teste hiposmótico foi calculado no presente trabalho através da formula: $HO^C = (HO^B - ENR)/(100 - ENR)$. Os valores foram apresentados na forma de porcentagem.

Para o teste de coloração supravital 20 μ L de sêmen foram adicionados a 40 μ L de corante eosina-nigrosina previamente aquecidos por 40 segundos. Em seguida foi confeccionado um esfregaço em lâmina e imediatamente seco ao ar e observado em aumento de 400x para contabilização dos espermatozóides corados, sendo estes computados como lesionados.

Após estas análises a concentração espermática foi mensurada, em câmara hematimétrica, por meio da diluição de 20 μ L de sêmen em 1 mL de formol salino tamponado e contagem das células presentes dentro do espaço da câmara, sendo a concentração determinada com base no fator de diluição. Em seguida o sêmen foi centrifugado a 300g por dez minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* formado ressuspenso em meio diluidor a base Tris-citrato (Schäfer-Somi et al., 2005, Anexo

1) contendo 6% de glicerol de forma a obter-se concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL.

O sêmen foi então envasado em palhetas de 0,25 ml e em seguida acondicionado em tubos de ensaio com tampa, pré-aquecidos. Os tubos de ensaio foram posicionados dentro de um recipiente de vidro contendo 650 mL de água a 38°C. O recipiente de vidro por sua vez foi fechado hermeticamente e submergido em 7L de água+gelo contidos dentro de caixa de isopor. Os volumes, tanto de água a 38°C quanto de gelo foram previamente ajustados de forma que a curva de resfriamento resultante atinge 4°C em um período de 1 hora. Após o resfriamento o sêmen foi mantido na caixa de isopor por mais 1 hora em equilíbrio a 4°C, antes do congelamento. O congelamento foi realizado em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido, através do posicionamento do sêmen envasado a 10 cm da superfície do nitrogênio por 10 minutos.

Passados uma semana as palhetas foram descongeladas através de imersão em água a 38°C por 1 minuto. Em seguida o sêmen foi transferido para frascos tipo *eppendorf* de 1,5ml mantidos incubados em banho-maria a 38°C para análise do vigor, motilidade e a integridade de membrana como descrito para o sêmen fresco.

A longevidade espermática foi estimada no sêmen descongelado através do teste de termorresistência. Para tanto o sêmen foi incubado em banho-maria a 38°C por 2 horas sendo que neste período seu vigor e motilidade foram avaliados em intervalos de 15 minutos. Os dados de vigor e motilidade obtidos durante o teste de termorresistência são apresentados na forma de índice espermático.

Os dados avaliados foram descritos quanto à média e respectivo desvio padrão. Para a comparação das médias foi calculado o intervalo médio de confiança com margem de 5% de erro através da função estatística do programa Excel Windows XP. Os dados de correlação foram calculados com base na Correlação de Pearson através do programa Texassoft, Winks DAS Software, 6^a ed, Cedar Hill, Texas 2007.

5.3 - Resultados e Discussão

Variações individuais na congelabilidade do sêmen são descritas em várias espécies, inclusive no cão (England, 1993; Batista et al., 2006). A maioria dos trabalhos desenvolvidos na espécie canina que avaliam a qualidade do sêmen pré e

pós-congelamento, utiliza sêmen de diferentes animais agrupados em “pools”, de forma que não é possível comparar a qualidade individual do sêmen antes e depois do congelamento (Rota et al., 1995; Peña et al., 1998; Peña e Linde-Foresberg, 2000; Santos et al., 2003; Martins-Bessa et al., 2006). Entretanto, Batista et al. (2006) compararam o vigor e motilidade pré e pós-congelamento, do sêmen de indivíduos de cães da raça Mastiff e verificaram diferenças estatisticamente significativas na avaliação do sêmen descongelado, mas não no sêmen fresco. No presente trabalho, foi observada variação significativa entre as médias individuais e raciais de integridade e viabilidade de membrana espermática e de índice espermático na avaliação do sêmen descongelado (Tabela 1, 2 e 4). Na avaliação do sêmen fresco observou-se variação individual significativa apenas na integridade e viabilidade da membrana espermática, já quando se compara os dados agrupados em raças nenhuma variação significativa foi observada (Tabela 1, 2 e 3). Na tabela 1, é possível observar, entre indivíduos, diferença estatisticamente significativas no percentual de células reativas ao teste hiposmótico e à coloração supravital, tanto antes como após o congelamento, entretanto, o número de indivíduos apresentando diferença nas médias percentuais, bem como a amplitude desta diferença foram maior na avaliação do sêmen descongelado. Alguns autores atribuem variações individuais na qualidade do sêmen descongelado, como as observadas no presente trabalho, a diferenças na composição lipídica da membrana espermática e na sensibilidade do espermatozóide aos efeitos tóxicos do glicerol (Hammerstedt et al., 1978; Cross, 1998, Watson, 2000).

A habilidade dos espermatozoides de sobreviver ao processo de congelamento pode ser ligada a características individuais, que não são completamente elucidadas pela avaliação *in vitro* do sêmen fresco. Entretanto, algumas características seminais, como a porcentagem de células apresentando anormalidades morfológicas, são altamente correlacionadas com baixas taxas de fertilidade em cães (Oettlé, 1993; Thomassen et al., 2006). Santos et al. (2006) descrevem a ocorrência de altas taxas de anormalidades morfológicas no sêmen de quatro indivíduos da raça Schnauzer, resultando em perda da fertilidade. Os autores atribuem a presença das taxas de anormalidade excepcionalmente altas nos quatro indivíduos estudados, ao elevado grau de consangüinidade observado entre estes animais.

Na avaliação das médias raciais, embora não haja diferença estatisticamente significativa nos valores de índice espermático imediatamente após o descongelamento, os animais da raça Schnauzer apresentaram os menores valores de índice espermático durante o todo o teste de termorresistência. Esta observação pode de certa forma correlacionar-se com o relato feito por Santos et al., (2006) de índices de anormalidades morfológicas excepcionalmente altos em indivíduos da raça Schnauzer, de forma a caracterizar um padrão geral de baixa qualidade seminal nesta raça. Entretanto, se avaliarmos a diferença entre os valores médios de índice espermático ao descongelamento e 45 minutos após, observamos um percentual de queda bastante semelhante entre as diferentes raças. Na avaliação individual valores particularmente baixos também são observados em indivíduos da raça Schnauzer, quanto aos testes de integridade e viabilidade da membrana espermática (Tabelas 1). Ao contrário a análise da variação racial de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico no sêmen descongelado, demonstra grande superioridade dos valores obtidos na raça Dobermann (Tabela 4).

Tabela 1 - Médias individuais de percentual de células reativas ao teste hiposmótico e percentual de células coradas no teste de coloração supravital, no sêmen fresco e descongelado.

	Coloração supravital no sêmen fresco (%)	Teste hiposmótico no sêmen fresco (%)	Coloração supravital no sêmen descongelado (%)	Teste hiposmótico no sêmen descongelado (%)
Beagles				
1	10,50 ^{bc}	88,24 ^{bcd}	62,00 ^{abcd}	
2	4,33 ^a	77,21 ^b	77,00 ^d	16,67 ^{abc}
3	5,50 ^{ab}	94,75 ^{cd}	66,50 ^c	11,51 ^b
Schnauzer				
1	4,33 ^{ab}	97,92 ^d	58,67 ^{abc}	27,05 ^{bc}
2	8,67 ^{abc}	78,52 ^b	81,00 ^d	0,48 ^a
3	17,0 ^c	52,1 ^a	85,0 ^d	0,0
Dobermann				
1	4,33 ^{ab}	92,92 ^c	59,67 ^b	48,46 ^c
2	8,50 ^{abc}	95,21 ^d	67,67 ^c	35,06 ^c
3	24,33 ^c	81,61 ^{bc}	70,67 ^{bcd}	11,11 ^a
Boxer				
1	4,67 ^{ab}	93,09 ^{cd}	40,00 ^a	40,24 ^c
2	21,00 ^c	95,61 ^{cd}	61,33 ^{abcd}	6,37 ^a
3	6,67 ^b	94,45 ^{cd}	57,67 ^{abc}	25,04 ^b

Letras diferentes na mesma coluna representam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Embora todas as raças caninas tenham ancestrais em comum, durante seu desenvolvimento e mesmo nos dias atuais, seleções genéticas extremamente endogâmica são realizadas, no intuito de fixar características fenotípicas ou comportamentais desejáveis (Leppänen et al., 2000; Schelling et al., 2005; Leroy et al., 2006). Desta forma, a proximidade genética e o grau de endogamia observado entre cães da mesma raça podem influenciar a qualidade *in vitro* do sêmen descongelado através da fixação de características individuais associadas a aumento ou diminuição da sobrevivência dos espermatozoides ao processo de congelamento.

A genética de uma raça é, em linhas gerais, determinada pela genética de seus fundadores efetivos, que são aquele indivíduos pertencente à população total de fundadores mas que tiveram maior contribuição na formação da população atual por meio de um grande número de descendentes (Leroy et al, 2006). Os cães avaliados no presente trabalho são exemplares altamente representativos do padrão morfológico das respectivas raças, sendo representantes da genética de suas raças uma vez que tanto eles quanto seus ancestrais diretos contribuíram para a formação do plantel atual com um grande número de progênes.

Tabela 2- Médias individuais de índice espermático no sêmen fresco, e no sêmen descongelado momento do descongelamento (T⁰), e 15 (T¹), 30 (T²) e 45 (T³) minutos após.

	Índice espermático no sêmen fresco (%)	Índice espermático T ⁰ (%)	Índice espermático T ¹ (%)	Índice espermático T ² (%)	Índice espermático T ³ (%)
Beagle					
1	93,33	55,00 ^{cd}	55,00 ^d	35,00 ^b	22,50 ^b
2	85,00	40,83 ^{abcd}	21,67 ^b	15,00 ^a	0,00
3	95,00	47,50 ^{bcd}	30,00 ^c	26,25 ^a	21,50 ^b
Schnauzer					
1	95,00	59,17 ^{cd}	32,50 ^c	14,33 ^a	6,83 ^a
2	86,67	30,00 ^a	0,00 ^a	0,00	0,00
3	80,0	32,5 ^b	0,0	0,0	0,0
Doberman					
1	95,00	43,33 ^{bcd}	38,33 ^c	22,50 ^a	7,50 ^a
2	90,00	58,33 ^d	48,33 ^d	35,00 ^{ab}	24,17 ^b
3	73,33	40,83 ^{bcd}	27,83 ^{bc}	0,00	0,00
Boxer					
1	95,00	65,00 ^{cd}	55,00 ^d	44,17 ^b	30,00 ^b
2	91,67	53,33 ^{cd}	24,17 ^{bc}	20,50 ^a	6,83 ^a
3	95,00	60,83 ^{cd}	35,00 ^{bcd}	26,83 ^{ab}	17,00 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna representam médias significativamente diferentes (p<0,05).

Um dos grandes entraves ao melhoramento da técnica de criopreservação de sêmen em cães é a forma de estimar a fertilidade do sêmen após o descongelamento. Testes *in vivo*, embora decisivos na determinação da fertilidade do sêmen, requerem um grande número de animais por tratamento avaliado e estão sujeitos a variações outras que não especificamente a qualidade do sêmen como: a fertilidade individual da fêmea, a detecção do momento ótimo de inseminação, o método de inseminação, a dose e volume inseminante, entre outros (Eilts, 2005). Análises feitas *in vitro* por sua vez são bastantes práticas e possibilitam a avaliação simultânea de grande número de tratamentos, entretanto, para serem conclusivas, necessitam de prévia confirmação de sua correlação com a taxa de fertilidade através de testes *in vivo*. Neste sentido diversos trabalhos têm sido feitos correlacionando os parâmetros de avaliação seminais *in vitro* entre si e com a taxa de fertilidade (Smith et al., 1977; Oettlé, 1993, Neild et al., 2000; Peña Martinez, 2004; Thomassen et al., 2006).

Tabela 3- Médias de percentual de células reativas ao teste hiposmótico e percentual de células coradas no teste de coloração supravital e de índice espermático no sêmen fresco, em cães da raça Beagle, Schnauzer, Doberman e Boxer.

	Coloração supavital sêmen fresco	Teste hiposmótico sêmen fresco	Índice espermático sêmen fresco
Média da raça Beagle	6,78±2,67 ^a	86,73±7,24 ^a	91,11±4,37 ^a
Média da raça Schnauzer	6,50±2,17 ^a	88,22±9,70 ^a	90,83±4,17 ^a
Média da raça Doberman	12,39±8,62 ^a	89,91±5,94 ^a	86,11±9,26 ^a
Média da raça Boxer	10,78±7,27 ^a	94,38±1,03 ^a	93,89±1,57 ^a

Dados apresentados em Média ± Desvio Padrão.

Letras diferentes na mesma coluna representam médias significativamente diferentes (p<0,05).

Tabela 4- Médias de percentual de células reativas ao teste hiposmótico e percentual de células coradas no teste de coloração supravital e de índice espermático no sêmen descongelado momento do descongelamento (T⁰), e 15 (T¹), 30 (T²) e 45 (T³) minutos após, em cães da raça Beagle, Schnauzer, Doberman e Boxer.

	Coloração supravital sêmen descongelado	Teste hiposmótico sêmen descongelado	Índice espermático sêmen descongelado (T ⁰)	Índice espermático sêmen descongelado (T ¹)	Índice espermático sêmen descongelado (T ²)	Índice espermático sêmen descongelado (T ³)
Média da raça Beagle	69,7±8,84 ^a	14,60±18,48 ^a	46,79±17,41 ^a	33,57±15,58 ^{ab}	23,93±11,09 ^b	12,57±11,62 ^b
Média da raça Schnauzer	72,00±13,76 ^{ab}	11,80±18,89 ^a	42,86±15,67 ^a	13,93±16,14 ^a	6,14±9,73 ^a	2,93±7,17 ^a
Média da raça Doberman	63,67±4,89 ^{ab}	41,76±8,26 ^b	50,83±13,74 ^a	43,33±6,87 ^b	28,75±9,97 ^b	15,83±18,30 ^b
Média da raça Boxer	53,00±14,80 ^b	23,89±21,57 ^a	59,72±10,17 ^a	38,06±16,57 ^{ab}	30,50±14,23 ^b	17,94±16,53 ^b

Dados apresentados em Média ± Desvio Padrão.

Letras diferentes na mesma coluna representam médias significativamente diferentes (p<0,05).

A movimentação dos espermatozóides é um parâmetro de avaliação de fácil mensuração e ao mesmo tempo representa um bom indicador da função espermática uma vez que a movimentação é uma manifestação dos componentes estruturais e funcionais do espermatozóide, altamente correlacionada com a taxa de fertilidade, normalidade morfológica e integridade da membrana espermática (Smith et al., 1977; Oetlé, 1993; Peña Martinez, 2004; Thomassen et al., 2006). A avaliação da movimentação dos espermatozóides descongelados em diferentes intervalos de tempo através do teste de termorresistência é tida como um bom parâmetro preditor da fertilidade espermática em várias espécies. Baixas taxas de sobrevivência no teste de termorresistência têm sido associadas com baixa fertilidade (England, 1993). O sêmen canino tem a característica particular de baixo desempenho no teste de termorresistência quando comparado ao de outras espécies. Esta característica entretanto, não é necessariamente associada à baixa fertilidade visto que em alguns estudos, amostras de sêmen com relativo baixo desempenho neste teste apresentaram taxas de fertilidade normais (Cardoso et al., 2005).

As alterações na permeabilidade da membrana espermática são em última análise reflexo de danos estruturais na membrana e de alterações metabólicas causados pelo resfriamento dos espermatozóides. Estas alterações podem prejudicar

a qualidade do sêmen através da redução de sua motilidade e de sua capacidade de ligar-se ao óvulo (Amann e Pickett, 1987; Holt, 2000; Bailey et al., 2000). A integridade e viabilidade da membrana espermática são comumente avaliadas através do teste hiposmótico e do teste de colorações supravitais. O teste hiposmótico baseia-se na reação de enrolamento da cauda do espermatozóide intacto, com membrana citoplasmática funcional quando exposto a um meio hiposmótico (England e Plummer, 1993). Este teste foi correlacionado com a porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais no ejaculado e a taxa de fertilidade em garanhões (Neild et al., 2000).

As colorações supra-vitais são classicamente utilizadas para diferenciar espermatozóides vivos e mortos (Dott e Foster, 1972; Peña Martínez, 2004; Pinto e Kozink, 2007; Kustritz, 2007). A coloração supravital com eosina-nigrosina é a mais comumente utilizada e consiste basicamente de diferenciação dos espermatozóides vivos e mortos através de sua afinidade com o corante eosina (Dott e Foster, 1972). O teste de coloração supravital com eosina-nigrosina tem sido positivamente correlacionado com a motilidade espermática (Kumi-Diaka, 1993; Rodriguez-Gil et al., 1994; Pinto e Kozink, 2007).

Embora Nöthling et al. (1997) e Batista et al.,(2006), tenham observado que a qualidade seminal *in vitro* avaliada a fresco, apresenta baixa correlação com o desempenho pós-descongelamento, no presente trabalho, a avaliação da movimentação dos espermatozóides através do índice espermático no sêmen fresco é significativamente correlacionado com os testes de integridade e viabilidade da membrana espermática e o teste de termorresistência após o descongelamento (Tabela 5). O teste hiposmótico realizado no sêmen fresco também se apresentou significativamente correlacionado com os testes de coloração supravital e teste de termorresistência (Tabela 5). Já o teste de cloração supravital realizado no sêmen a fresco correlacionou-se significativamente apenas com o teste hiposmótico no sêmen descongelado.

Tabela 5- Correlação entre os valores de índice espermático, porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico e porcentagem de células coradas pela coloração supravital avaliados no sêmen fresco e descongelado.

	IE ^F	EN ^F	HO ^F	EN ^D	HO ^D	IE0	IE1	IE2	IE3
IE ^F	1	-0,68 (0,0)	0,619 (0,0)	-0,351 (0,049)	0,422 (0,02)	0,458 (0,008)	0,36 (0,043)	0,501 (0,004)	0,294 (0,102)
EN ^F		1	-0,267 (0,23)	0,214 (0,339)	-0,464 (0,034)	-0,119 (0,598)	-0,192 (0,392)	-0,409 (0,059)	-0,173 (0,441)
HO ^F			1	-0,473 (0,006)	0,404 (0,027)	0,438 (0,012)	0,0489 (0,005)	0,416 (0,018)	0,327 (0,068)
EN ^D				1	-0,473 (0,008)	-0,468 (0,007)	-0,617 (0,0)	-0,480 (0,005)	-0,420 (0,017)
HO ^D					1	0,305 (0,101)	0,684 (0,0)	0,530 (0,003)	0,459 (0,011)
IE0						1	0,649 (0,0)	0,687 (0,0)	0,481 (0,005)
IE1							1	0,837 (0,0)	0,661 (0,0)
IE2								1	0,771 (0,0)
IE3									1

Dados apresentados na forma de Correlação de Pearson , (nível de significância).

IE designa o índice espermático no sêmen fresco (IE^F), no sêmen ao descongelamento (IE0) e 15, 30 e 45 minutos após (IE1, IE2 e IE3).

HO designa a porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico no sêmen fresco (HO^F) e descongelado (HO^D).

EN designa a porcentagem de células coradas pela coloração supravital no sêmen fresco (EN^F) e no sêmen descongelado (EN^D).

5.4 – Conclusões

Com base nos dados de avaliação *in vitro* do sêmen de cães apresentados no presente trabalho podemos concluir que embora a qualidade do sêmen a fresco não apresente variação significativa entre as raças estudadas, a integridade e viabilidade da membrana e longevidade espermáticas do sêmen descongelado varia significativamente tanto entre indivíduos quanto entre raças. Desta forma, a habilidade do espermatozóide canino de sobreviver ao processo de congelamento é individualmente variável sendo que esta variação pode apresentar alguns componentes geneticamente herdados que se manifestam como característica de congelabilidade seminal das raças.

Podemos ainda concluir que, a avaliação da motilidade e integridade de membrana espermática em amostras do sêmen fresco são significativamente

correlacionados com a integridade e viabilidade da membrana espermática e a longevidade dos espermatozoides descongelados.

5.5 – Referências Bibliográficas

AMANN, R. P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Sci** , v.7, p.145-173, 1987.

BATISTA, M.; ALAMO, D.; GONZÁLES, F.; CRUZ, M.G.; GARCIA, A. Influence of freezing technique (Nitrogen liquid vs Ultrafreezer of -152⁰ C) and male-to-male variation over semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 41, p. 423-428, 2006.

BAILEY, L.J.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Andr.**, v.21, n.1, p.1-7, 2000.

CARDOSO, R. C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. **Ver. Bras. Reprod. Anim.**, v.29, n.314, p.179-187, 2005.

CBKC - CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE KENNES KLUBS. *Relatório anual de atividades cinófilas*, 2005. Disponibilidade e acesso: <<http://www.cbkc.org.br>> Acessado em 5 de novembro de 2007.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal** (2ed), Belo Horizonte, CBRA, 49p, 1998.

CROSS, N. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol. Reprod.**, v.59, p.7-11, 1998.

DOTT, H.M. E FOSTER, G.C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential “live/dead” stain. **J. Reprod. Fert.**, v.29, p.443-445, 1972.

- EILTS, B.E. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. **Theriogenology**, v.64, p.685-691, 2005.
- ENGLAND, G.C. Criopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fertil. Suppl**, v.47, p.234-255, 1993.
- ENGLAND, G.C. and PLUMMER, J.M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. **J. Rep. Fer. Suppl**, v.47, p. 216-270, 1993.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Andr.**, v.11, n.1, p.73-87, 1990.
- HAMMERSTEDT, R.H.; KEITH, A.D.; SNIPES, W. AMAN, R.P.; ARRUDA, D.; GRIEL, L.J. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolarity and osmolality on sperm. **Biol. Reprod.**, v.18, p.686-696, 1978.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Scie.**, v.62, p.3-22, 2000.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, p. 1279-1289, 1993.
- KUSTRITZ, M.V.R. The value of canine semen evaluation for practitioners. **Theriogenology**, v.68, p.329-337, 2007.

- LEPPÄNEN, M.; MÄKI, K.; SALONIEMI, H. Estimation of heritability of hip dysplasia in German Shepherd Dogs in Finland. **J. Anim. Breed. Geneti.**, v. 117, p.97-103, 2000.
- LEROY, G.; ROGNON, X.; VARLET, A.; JOFFRIN, C.; VERRIER, E. Genetic variability in french dog breeds assessed by pedigree data. **J. Anim. Breed. Geneti.**, v. 123, p.1-9, 2006.
- LINDE-FORSBERG,C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. **Sem. Vet. Med and Surg. (Small Animal)**, v.10, n.1, p.48-58, 1995.
- MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. **Theriogenology**, v.66, p.2047-2055, 2006.
- MASCARENHAS, R.M.; PAULA. T.A.R.; MATTA, S.L.P.; LANNA. L.L.; FONSECA, C.C.; NEVES, M.T.D. Morfometria Macro e Microscópica e Índices Somáticos dos Componentes Testiculares de Cães Sem Raça Definida, da Puberdade à Senilidade. **Revista CERES**, v.53, p.106-112, 2006.
- MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, 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 oncelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.2027-2041, 2002.
- NEILD, D.M.; CHAVES, M.G.; FLORES, M.; et al. The HOS test and its relationship to fertility in thee stallion. **Andrologia**, v.32, p.351-355, 2000.

- NÖTHLING, J.O.; GERSTENBERG, C.; VOLKMANN, D.H. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.51, p.109-116, 1997.
- OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **J. Rep. Fert. Suppl.**, v.47, p.257-260, 1993.
- PATTERSON, D.F. Understanding and controlling inherited diseases in dog and cat. **Tidjschr. Diergeneeskd.**, v. 118, p.23-27, 1993.
- PEÑA MARTÍNEZ, A.I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Anim. Repro. Sci.**, v.82-83, p.209-224, 2004.
- PEÑA , A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-875, 2000.
- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A. HERRADÓN, P.G. Effects of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-174, 1998.
- PINTO, C.R.F.; KOZINK, D.M. Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, (2007), doi: 10.1016.2007.07.005.
- RIJSEELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**, v.64, p.706-719, 2005.

- RODRIGUEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.42, p.815-829, 1994.
- ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparison between glycerol and ethyleneglycol for dog semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1848-1858, 2006.
- ROTA, A.; STÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4⁰C. **Theriogenology**, v.44, p.885-900, 1995.
- SANTOS, R.N.; KREKELER, N.; SCHRAMMA-JOSSEN, A.; VOLKMANN, D.H. The knobbed acrosome defect in four closely related dogs. **Theriogenology**, v.66, p.1626-1628, 2006.
- SANTOS, I.W.; LIMA, V.F.M.H.; NISFELD, L.C.; RIBEIRO, A.P.C. Congelamento do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio. **Arch. Vet. Sci.**, v.8, n.2, p.57-62, 2003.
- SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E.; KLEIN, D.; AURICH, C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, n2, p.173-182, 2005.
- SCHELLING, C.; GAILLARD, C.; DOLF, G. Genetic variability of seven dog breeds based on microsatellite markers. **J. Brees. Genet.**, n.122, p.71-77, 2005.
- SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B. et al. Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Vet. Rec.**, v.138, p.154-157, 1996.

SMITH, K.D.; RODRIGUEZ-RIGAU, L.J.; STEINBERGER, E. Relation between indices of sêmen analysis and preganangy rate in infertile couples. **Fert. Steril.**, v.28, n.12, p. 1314-1319,1977.

THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, J.A.; ANDERSEN BERG, K.; FARSTAD, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. **Theriogenology**, v.66, p.1645-1650, 2006.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, n. 60-61, p.481-492, 2000.

6-COMCLUSÕES GERAIS

- Com base nos dados de avaliação *in vitro* do sêmen de cães apresentados no presente trabalho podemos concluir que embora a qualidade do sêmen a fresco não apresente variação significativa entre as raças estudadas, a integridade e viabilidade da membrana e longevidade espermáticas do sêmen descongelado varia significativamente tanto entre indivíduos quanto entre raças. Desta forma, a habilidade do espermatozóide canino de sobreviver ao processo de congelamento é individualmente variável sendo que esta variação pode apresentar alguns componentes geneticamente herdados que se manifestam como característica de congelabilidade seminal das raças.
- Os efeitos das variações na concentração de glicerol no meio diluidor, da presença do tempo de equilíbrio e de taxa rápida ou lenta de congelamento sobre a integridade e viabilidade da membrana espermática e sobre o índice espermático, podem apresentar-se isoladamente pouco significativos, porém em associação, estas variáveis apresentam efeito sinérgico, aumentando a qualidade *in vitro* do sêmen canino descongelado.
- O protocolo de congelamento que associa o meio diluidor com 6% de glicerol, o tempo de resfriamento de 1 hora e a taxa lenta de congelamento apresentou melhor desempenho na avaliação *in vitro* dos parâmetros de motilidade e longevidade espermática e viabilidade e integridade de membrana plasmática.
- A avaliação da motilidade e integridade de membrana espermática em amostras do sêmen fresco são significativamente correlacionados com a integridade e viabilidade da membrana espermática e a longevidade dos espermatozoides descongelados.

ANEXO 1 – Composição do meio diluidor base

<i>Ingredientes</i>	Quantidade
TRIS(hidroximetil)-aminometano	3,025 g
Acido Cítrico	1,7 g
Frutose	1,25g
Gema de ovo	20 ml
Estreptomicina	1 g
Água destilada qsp	100ml

Schäfer-Somi et al., 2005