

AMANDA CARLA ACIPRESTE

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO, UTILIZANDO
ASSOCIAÇÕES DE CRIOPROTETORES E DOIS
PROTOCOLOS DE DESCONGELAMENTO**

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
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A181c
2006

Acipreste, Amanda Carla, 1980-

Criopreservação de sêmen canino, utilizando associações de crioprotetores e dois protocolos de descongelamento / Amanda Carla Acipreste. – Viçosa : UFV, 2006.

xii, 59f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 45-58.

1. Cão - Sêmen - Criopreservação. 2. Sêmen - Criopreservação. 3. Sêmen - Descongelamento. 4. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.7089261

AMANDA CARLA ACIPRESTE

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO, UTILIZANDO
ASSOCIAÇÕES DE CRIOPROTETORES E DOIS
PROTOCOLOS DE DESCONGELAMENTO**

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: 09 de junho de 2006.

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Co-orientador)

Prof. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
(Co-orientador)

Dr. Orlando Marcelo Vendramini

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho

Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

“Tudo Posso Naquele que me Fortalece”
(Filipenses, 4 – 13).

*“Nunca Deixe de Ser Feliz, Até
Mesmo Quando Der um Passo pra
Frente é Deixar Algo Para Trás”.*
(Autor desconhecido)

Graças a Deus todo poderoso, por me proporcionar uma família linda, meu porto seguro e exemplo de vida. Tanto amor, dedicação e incentivo são razões as quais fizeram realidade aos meus sonhos.

AMO VOCÊS!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Carlos Roberto Acipreste e Luzia Isabel de Oliveira Acipreste, ao meu irmão Raphael Augusto Acipreste, a minha cunhada Carla Pereira Kaizer Acipreste e ao meu querido sobrinho Carlos Roberto Acipreste Neto pelo apoio, pela compreensão, pelo amor e pelo carinho; sem vocês nada disto estaria fazendo sentido. **MEUS ALICERCES, AMO VOCÊS FAMÍLIA!!!**

Ao meu amor, Maurício Antônio Fiorini Galvão que esteve ao meu lado em todos os momentos, por sua compreensão e incentivo. **AMO VOCÊ MEU ANJO !!!**

Ao meu orientador, e segundo pai, professor Eduardo Paulino da Costa, pelo empenho, paciência e incentivo. Obrigada pelo carinho com que teve comigo durante esses dois anos.

Aos membros da banca examinadora, professores Tarcízio Antônio Rêgo de Paula (Presidente), Ciro Alexandre Alves Torres, Giovanni Ribeiro Carvalho e ao Orlando Marcelo Vendramini, por participarem da equipe e pelas sugestões.

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e ao Departamento de Veterinária que contribuiu para o meu crescimento profissional.

Ao meu querido amigo, muito especial, Fabrício Albani OLiveira, pelo apoio, e dedicação nos momentos de dificuldades na realização deste trabalho. Valeu Falboli, esse mérito é nosso !!!

Aos meus colegas, Nicola, Camila, Bruno, Flávio, Éder, Leonardo, Charles e Carlos por tudo que fizeram por mim na colaboração da realização deste trabalho.

Às minhas **AMIGAS AMADAS**, Caroline Lavocat Nunes, Jeanne Broch Siqueira e Rejane Fraga, sem vocês nada disso teria sentido. Obrigada por tudo!!!
AMO VOCÊS!!

Ao seu Nenzinho e a Rosinéia pela amizade, carinho e atenção. Parabéns pela dedicação excepcional de vocês para conosco.

A todos os meus amigos que, direta ou indiretamente, participaram na realização deste trabalho, ajudando-me e apoiando-me nos momentos difíceis da vida, pela confiança e pelo carinho!!!

MUITO OBRIGADA!!!

BIOGRAFIA

AMANDA CARLA ACIPRESTE, filha de Carlos Roberto Acipreste e Luzia Isabel de Oliveira Acipreste, nasceu em Barra do São Francisco - ES, em 23 de fevereiro de 1980.

Em 1999, ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Castelo – FACASTELO, Castelo – ES, graduando-se em julho de 2004.

Em agosto de 2004, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Reprodução Animal, tendo defendido a dissertação de Mestrado em junho de 2006.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Etapas do processamento do sêmen na criopreservação.....	4
2.1.1. Avaliação da qualidade espermática.....	4
2.1.2. Diluição do sêmen.....	6
2.1.3. Componentes do meio diluidor	6
2.1.4. Meios diluidores para o congelamento de sêmen canino.....	10
2.1.5. Centrifugação do sêmen.....	11
2.1.6. Períodos de resfriamento e equilíbrio do sêmen.....	12
2.1.7. Criopreservação dos gametas masculinos.....	13
2.1.8. Os crioprotetores do sêmen.....	14
2.1.9. Curva de congelação espermática.....	18
2.1.10. Descongelamento.....	19
2.2. Métodos de análise do sêmen criopreservado.....	21
2.2.1 Análises in vivo da qualidade espermática do sêmen criopreservado.....	22
2.2.2 Análises in vitro da qualidade espermática do sêmen criopreservado.....	22

3. MATERIAL E MÉTODOS	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
7. ANEXO.....	59

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Composição do meio Tris-citrato, utilizado como diluente base do sêmen, nos diferentes tratamentos (T1, T2 e T3).....	29
2. Classificação dos espermatozoides, quanto a integridade da membrana plasmática e acrossomal, submetidos a técnica de coloração com diacetocarboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP).....	32
3. Características seminais de cães da raça Labrador do Retriever, utilizados, como doadores de sêmen para o experimento.....	34
4. Motilidade progressiva média de sêmen canino congelado, com diferentes associações de crioprotetores, submetido ao teste de termoresistência (TTR) após descongelamento.....	35
5. Valores médios do vigor espermático obtidos durante o teste de termoresistência (TTR) após descongelamento, nas amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas à criopreservação com diferentes associações crioprotetoras.....	36
6. Valores percentuais médios do teste hipo-osmótico (Teste hiposmótico) em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas à criopreservação com diferentes associações crioprotetoras.....	41
7. Valores percentuais médios da integridade de membrana plasmática de amostras seminais de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas à criopreservação com diferentes associações crioprotetoras	42

RESUMO

ACIPRESTE, Amanda Carla, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2006.
Criopreservação de sêmen canino, utilizando associações de crioprotetores e dois protocolos de descongelamento. Orientador: Eduardo Paulino da Costa.
Co-orientadores: Ciro Alexandre Alves Torres e Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da associação de crioprotetores permeáveis e impermeáveis em um mesmo meio diluidor e comparar dois protocolos de descongelamento de sêmen canino. Foram utilizados três machos adultos da raça Labrador do Retriever, os quais foram submetidos a uma coleta de sêmen semanal durante o período de cinco semanas, totalizando quinze amostras em cada delineamento experimental. Os testes *in vitro* aplicados às amostras de sêmen foram a avaliação da motilidade progressiva, o vigor espermático, a avaliação de integridade da membrana plasmática e do acrossoma e avaliação da longevidade espermática. O meio diluente base utilizado para as associações de crioprotetores foi o Tris-citrato: (G1) (Tris-citrato modificado/ = 3% Dimetil-formamida + 3% Glicerol); (G2) (Tris-citrato modificado/ = 3% Dimetil-formamida + 3% Trealose) e (G3) (Tris-citrato/ = 4% Glicerol). Quanto ao método de descongelamento do sêmen, foi avaliado um protocolo de descongelamento rápido (75°C/ 7" e 37°C/ 1 minuto) e um protocolo de descongelamento lento (37°C/ 1 minuto). Foi verificada diferença ($P < 0,01$) entre as associações crioprotetoras testadas, de forma que foi apresentada superioridade aos grupos G1 e G3, quando comparado aos resultados inferiores demonstrados pelo G2. Porém, avaliando separadamente cada associação crioprotetora, não houve diferença ($P > 0,01$) ao utilizar distintos protocolos de descongelamento, sendo um rápido e outro lento. Esses resultados indicam que a célula espermática criopreservada pela associação glicerol apresentou os melhores resultados, caracterizando maior eficácia na preservação dos espermatozoides da espécie canina comparado às demais associações testadas.

ABSTRACT

ACIPRESTE, Amanda Carla, M.S., Universidade Federal de Viçosa, June de 2006.
Criopreservation of canine semen using associations of crioprotectors and two protocols to unfreeze. Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: Ciro Alexandre Alves Torres and Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

The objective of this work was to evaluate the effect of permeable and unpermeable protocols in the same dilution media and to compare two unfrozen canine semen protocols. Three adults males from Labrador Retriever breed, were submitted to weekly collection of semen for five weeks, in a total of 15 samples in each experimental design. The *in vitro* testes applied to the semen samples were evaluation of: the progressive motility, the spermatic vigor, the integrity of plasma and acrosome membrane and the sperm longevity. The base mean diluent utilized for the crioprotectors associations was tris-citrate: (G1) (modified tris-citrate = 3% dimetil-formamide + 3% glycerol); (G2) (modified tris-citrate = 3% dimetil-formamide + threalose) and (G3) (tris-citrate = 4% glycerol). For the unfrozen semen, was used a fast unfrozen protocol (75 °C/ 7'') and the slow unfrozen protocol (37 °C/ 1'). A difference was detected ($P < 0.01$) among the tested associations, and the G1 and G3 associations were superior to the G2 one. But, evaluating each protector association separately, there was no difference ($P > 0.01$) when utilizing the fast and slow unfrozen protocols. These results showed that the glycerol cryopreserved sperm cell showed better results as compared to the others associations used in preserving the canine sperm cells.

1. INTRODUÇÃO

As biotécnicas de reprodução assistida, desde o início, foram direcionadas para as espécies de interesse econômico, sendo que as espécies de pequeno porte só adquiriram maior expressão com o crescimento da relação sentimental entre o homem e animal. A possibilidade de um intercâmbio de material genético e a preservação de gametas dessas espécies, como os cães de companhia e os animais da fauna brasileira em risco de extinção, como o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposinha do campo (*Pseudalopex sp.*), têm suscitado a necessidade de estabelecimento de um eficiente protocolo para a criopreservação do sêmen de carnívoros (FARSTAD, 1996).

Dentre as diferentes biotécnicas reprodutivas, têm-se destacado a criopreservação do sêmen canino, que visa sua utilização em inseminação artificial (IA) e armazenamento *in vitro* por tempo indeterminado de material de elevado valor genético, além de permitir o prolongamento artificial da vida reprodutiva do macho e redução na ocorrência de doenças transmitidas pela cópula (JOHNSTON *et al.*, 2001; LINDE-FORSEBERG, 1995, LINDE-FORSBERG, 1991).

Em 1954, foi notificado o primeiro congelamento de sêmen de cães (ROWSON, 1954). Sendo que os primeiros relatos de inseminação artificial que resultaram em prenhez de cadelas, com o uso de sêmen congelado, foram realizados em 1969 (SEAGER, 1969). Porém, as taxas de prenhez obtidas foram em torno de 10%. Desde então, diversas pesquisas foram realizadas, a fim de se obter métodos de criopreservação de espermatozóides de cães (ANDERSEN, 1972; SEAGER & FLETCHER, 1973; SEAGER *et al.*, 1975; ENGLAND & PONZIO, 1996).

Estudos têm revelado que o sêmen congelado de cão vem apresentando baixa qualidade pós-descongelamento, decorrendo em resultados insatisfatórios nas taxas de prenhez e tamanho da ninhada. Tais resultados denotaram um entrave na difusão prática da reprodução canina (ENGLAND, 1993; FARSTAD, 1984). No entanto, FARSTAD (1984), comparando as taxas de prenhez de cadelas, que estavam em momento ótimo de cruzamento, por meio de monta natural e inseminação artificial com sêmen congelado. Verificou uma taxa de parição de 92% para monta natural e 67% para inseminação artificial com sêmen congelado.

Em um programa de inseminação artificial em cães com sêmen congelado, observou-se durante um período de 10 anos os resultados da taxa de prenhez de 66,3% para o sêmen congelado (via intrauterina). O tamanho da ninhada das cadelas inseminadas com sêmen congelado foi 23,3% menor, quando comparado as inseminadas com sêmen fresco (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989).

Atualmente, diversas metodologias têm sido descritas com o intuito de melhorar a eficiência dos diluidores e crioprotetores empregados na refrigeração e criopreservação do sêmen canino. As razões de um meio diluidor ou crioprotetor conferir maior ou menor proteção aos espermatozóides de um determinado macho, deve-se ao fato de existirem diferenças na composição das membranas espermáticas entre as espécies, raças e indivíduos de uma mesma espécie (HOLT, 2000b).

A utilização de diversos crioprotetores e suas respectivas combinações podem minimizar e controlar os processos deletérios que ocorrem na célula espermática durante o congelamento e descongelamento possibilitando, conseqüentemente, melhores taxas de prenhez (PAPA *et al.*, 2003). DALIMATA & GRAHAM (1997), observaram que o uso combinado de diversos crioprotetores pode potencializar a ação dos mesmos.

O processo de descongelamento parece ser tão deletério para a célula espermática quanto congelamento e, os principais efeitos adversos são atribuídos a recristalização de microcristais do gelo intracelular (WATSON, 1981; WATSON, 1995; ZUCCARI, 1998; HOLT, 2000a). Contudo, a temperatura sob a qual se descongela uma amostra de sêmen influencia na viabilidade pós-descongelamento do mesmo, sendo descritas alterações no movimento espermático e na integridade das membranas (IVANOVA-KICHEVA *et al.*, 1995; WATSON, 1995; HOLT, 2000; PEÑA, 2000).

Alguns testes *in vitro* vêm sendo utilizados com o objetivo de analisar o sêmen criopreservado na espécie canina, visando melhorar os índices reprodutivos desses animais. Entre os testes indicados, está o teste hiposmótico, teste de termorresistência e técnica de coloração por fluorescência. Observou-se que estes testes, quando correlacionados com fertilidade, apresentaram resultados satisfatórios (ROTA, 1998).

O teste hiposmótico (HO) é utilizado para avaliar a funcionalidade e a integridade de membrana plasmática espermática, já o teste de termorresistência (TTR) é empregado na avaliação da longevidade do espermatozóide e as técnicas de coloração por fluorescência permitem a análise de integridade da célula espermática (ROTA, 1998).

Dessa forma, o objetivo do presente experimento visa avaliar o efeito da associação de crioprotetores permeáveis e impermeáveis em um mesmo meio diluidor e comparar dois protocolos de descongelamento um rápido e outro lento, visando melhorar a eficiência da criopreservação de sêmen de cão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Etapas do processamento do sêmen na criopreservação

2.1.1- Avaliação da qualidade espermática

A primeira descrição dos espermatozóides caninos foi realizada por Leeuwenhock em 1679 (OETTLÉ, 1993). Contudo, as diferenças morfológicas específicas dos espermatozóides entre as espécies só pôde ser diferenciada com o desenvolvimento da microscopia eletrônica (JOHNSTON, 1991). As diferenças estão relacionadas com o tamanho celular e composição da membrana espermática (MEDEIROS *et al.*, 2002). Os espermatozóides caninos possuem dimensões médias de 68 μ m de comprimento total; 7,0 μ m de comprimento por 5,0 μ m de largura de cabeça; 11 μ m de comprimento de peça intermediária e 50 μ m de comprimento de cauda (CHRISTIANSEN, 1988).

A produção diária de espermatozóides no cão está situada entre $11,7 \pm 0,5$ e $16,7 \pm 1,4 \times 10^6$ células por grama de parênquima testicular, sendo que a frequência da ejaculação não afeta esta produção diária. Porém, ocorre uma redução de 26% nas reservas localizadas nos epidídimos e nos ductos deferentes após seis a oito coletas de sêmen semanais ou uma coleta diária, comparativamente às reservas do reprodutor em repouso sexual (OLAR *et al.*, 1983).

O tamanho e a idade do animal esta relacionado quanto ao volume total de sêmen ejaculado, bem como da frequência e a quantidade de fluido prostático

coletado. Dados apresentam como normal um volume de sêmen entre 1 a 30 mL e com pH entre 6,3 e 6,7 (JONHSTON, 1991; FELDMAN & NELSON, 1996).

O número total de espermatozóides no ejaculado de um cão pode variar de 200 milhões a 10 bilhões, sendo o valor médio de 500 milhões de espermatozóides (SEAGER, 1986; JONHSTON, 1991; FELDMAN & NELSON, 1996). Variações podem ocorrer conforme a idade, peso testicular e sua atividade sexual. Na inseminação artificial, recomenda-se que o número total de espermatozóides por dose inseminante, para o sêmen congelado, esteja entre 150 e 400 milhões de espermatozóides quando a deposição seminal for realizada intravaginal ou cervical superficial. Entretanto, se a inseminação for intra-uterina esses valores podem ser bastante reduzidos (ANDERSON, 1980; LINDE-FORSBERG, 1995).

O efeito da concentração espermática sobre o índice de sobrevivência dos espermatozóides de cães após o descongelamento, foi melhor quanto à longevidade para os espermatozóides envasados em palhetas de 0,5 mL na concentração de 200×10^6 espermatozóides/mL (PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000).

A motilidade espermática progressiva é um importante parâmetro para a avaliação da qualidade seminal e deve ultrapassar 70% em uma amostra de sêmen normal, *in natura*. A avaliação deve sempre ser realizada com a amostra de sêmen à temperatura de 37°C e, imediatamente após a coleta. (LINDE-FORSBERG, 1991; FELDMAN & NELSON, 1996).

Entretanto, apesar da motilidade espermática ser o parâmetro mais utilizado na avaliação do sêmen, ocorre, em algumas condições, baixa capacidade fecundante com elevada motilidade espermática, devido a alterações verificadas em outras estruturas espermáticas, principalmente no acrossoma (ENGLAND, 1993).

Uma amostra de sêmen na espécie canina, para ser considerada normal quanto à morfologia espermática, pode ter a proporção de defeitos maiores e menores de, no máximo, 30%, sendo que o total de defeitos maiores não deve ser superior a 10% (CBRA, 1998). Acredita-se que a morfologia espermática se correlaciona melhor com a fertilidade que outros parâmetros de avaliação do sêmen (FELDMAN & NELSON, 1996). De uma maneira geral, concorda-se que, entre os defeitos espermáticos, a gota citoplasmática proximal altera a capacidade fecundante do espermatozóide, enquanto a gota citoplasmática distal e a inserção abaxial de cauda do espermatozóide, são defeitos que não afetam a fertilidade (MORTON & BRUCE, 1989).

Estudos, sobre a qualidade seminal de 34 machos relacionada com a fertilidade do sêmen, demonstraram que a avaliação morfológica do sêmen, isoladamente, não prediz a fertilidade. Porém, ejaculados apresentando poucos defeitos (com percentuais inferiores a 15%), devem ser capazes de produzir prenhez, em condições adequadas (ENGLAND & ALLEN, 1989). Contudo, o sêmen de baixa qualidade influencia tanto os índices de taxa de prenhez, quanto o número de filhotes por ninhada e que a utilização de doses inseminantes com concentração espermática elevada compensa, parcialmente, anormalidades morfológicas (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1993; LINDE-FORSBERG, 1995).

2.1.2 - Diluição do Sêmen

Para o congelamento, faz-se necessário o acréscimo de uma solução diluidora para auxiliar na preservação da integridade da membrana plasmática, que pode sofrer alterações causadas pela mudança de temperatura. Além disso, o diluidor contém fontes energéticas para o espermatozóide, estabiliza o pH do meio e mantém osmolaridade dentro dos padrões fisiológicos, além de prevenir o crescimento de bactérias (HAFEZ, 1995).

A taxa de diluição do sêmen, usualmente, está entre 1:3 a 1:5 (sêmen:diluidor), sendo que o volume final do sêmen diluído, não deve ultrapassar 5 a 10 mililitros, por dose inseminante (LINDE-FORSBERG, 1991).

2.1.3 - Componentes do Meio Diluidor

Um dos constituintes dos diluidores devem ser os sistemas tampões, pois o metabolismo das células espermáticas resulta em produção de íons de hidrogênio que tornam o meio ácido, levando a um decréscimo da longevidade e da fertilidade dos espermatozóides. O pH ótimo para essas células é próximo da neutralidade, logo, a maioria dos diluidores é tamponada com pH entre 6,9 e 7,1 (SMITH, 1984 citado por ENGLAND, 1993).

O fosfato foi primeiramente testado para este fim, porém o citrato de sódio, introduzido por Salisbury 1940, adaptou-se melhor para essa finalidade. O citrato de sódio aumenta a capacidade de diluição da gema de ovo ao meio líquido, fenômeno que favorece sobremaneira a ação da gema de ovo sobre os espermatozóides,

reduzindo o fator de choque térmico e por consequência aumentando o tempo de sobrevivência dos espermatozóides (PÉREZ & PÉREZ, 1984).

Algumas substâncias com poder de tamponamento, como o Tris (Tris-hidroximetil aminometano), Tes (N-tris(hidroximetil) metil 2-aminoetanosulfônico), citrato e fosfato de sódio, têm sido utilizadas na composição de meios diluidores para a preservação de gametas de cães (SILVA & VERSTEGEN, 1995; ROTA, 1998; SILVA, 2001). Observou-se que o meio citrato exerce melhor a função tamponante que o fosfato, e que o tampão bicarbonato é prejudicial à vida dessas células (FOOTE LEONARD, 1964; FOOTE, 1964).

Os meios tampões introduzidos mais recentemente são os íons dipolares, como o Tris (Tris-hidroximetil aminometano), associado ao citrato e à gema de ovo (GRAHAN *et al.*, 1972 citado por ENGLAND, 1993). Após a introdução desse tampão surgiram várias modificações que têm sido amplamente empregadas até a atualidade (SILVA & VERSTEGEN, 1995).

Com a adição da gema de ovo ao meio diluidor, previne-se algumas lesões primárias associadas ao choque térmico, as quais alteram a permeabilidade da membrana. Isto ocorre pela interação dos fosfolipídeos da gema do ovo com os constituintes das membranas espermáticas, tornando-as mais resistentes ao processamento do sêmen, além de prevenir a rotação da cauda dos espermatozóides, favorecendo assim sua motilidade (WATSON, 1981; ENGLAND, 1993; HOLT, 2000b).

A concentração da gema de ovo que deve ser adicionada ao meio diluidor foi estudada e, de maneira geral, os autores concordam que fique em torno de 20% (FOOTE & LEONARD, 1964; ANDERSEN, 1972; DAVIES, 1982 citado por ENGLAND, 1993).

Como substrato energético exógeno os açúcares são adicionados ao meio diluidor, além de atuarem como crioprotetores, mantêm a pressão osmótica do diluente (YILDIZ *et al.*, 2000; RIGAU *et al.*, 2002). Esta ação crioprotetora ocorre devido às interações, envolvendo ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfato localizados na cabeça dos fosfolipídios, podendo prevenir os danos causados pela desidratação extrema que pode ocorrer na congelação (DE LEEUW *et al.*, 1993). Os espermatozóides caninos obtêm sua energia a partir de processos glicolíticos, pois são capazes de desdobrar a glicose, frutose e manose (BARTLLET, 1962). Porém, RIGAU *et al.* (2001) citam que os

gametas masculinos apresentam uma motilidade maior e linear quando incubados com frutose, ao invés de glicose.

De acordo com YILDIZ *et al.* (2000), o uso dos açúcares trealose, xilose e frutose proporcionaram maiores taxas de espermatozóides caninos ativos após o descongelamento. Em contrapartida, a galactose, glicose, maltose, sacarose e rafinose não melhoraram esses índices. No entanto, a galactose, lactose, trealose, maltose e sacarose permitiram um decréscimo na proporção de células espermáticas com defeitos no acrossoma. O aumento da motilidade no pós-descongelamento ocorreu somente com a xilose e a frutose. Os monossacarídeos atuam melhor na preservação da motilidade espermática que os dissacarídeos no meio Tris citrato. Entretanto, o uso combinado de mono e dissacarídeos no meio diluente é mais efetivo na proteção dos espermatozóides que o uso de apenas um destes tipos de açúcares.

BORDIGNON *et al.* (1996), não obtiveram bons resultados na criopreservação do sêmen suíno, utilizando a trealose como agente crioprotetor. Estes autores observaram que na utilização de diferentes concentrações de Trealose (0, 0,1, 0,2, 0,3%) associado a 3% de glicerol, não foi possível verificar nenhum efeito sobre a motilidade espermática além da integridade de acrossoma e fertilidade do sêmen.

Entretanto, SNOECK *et al.* (2001), avaliando crioprotetores no congelamento de sêmen eqüino observaram que, mediante a associação da Acetamida na concentração de 2,5 3,5 e 5,0% associada a metilcelulose e trealose, podem ser usadas como alternativa crioprotetora para o sêmen eqüino. Após o descongelamento, a associação dessas moléculas preservou o sêmen dos animais quanto a motilidade progressiva tão bem quanto o glicerol a 5%, etileno-glicol a 2,5 e 3,5%.

Mais recentemente, componentes aditivos, como detergentes e aminoácidos têm sido adicionados ao meio diluidor (THOMAS *et al.*, 1992). A adição de compostos detergentes como o Equex STM paste ou o Orvus ES paste, ambos tendo como fração ativa o SDS (duodecil sulfato de sódio) em diluentes para congelação parece ser benéfica para várias espécies, incluindo a espécie canina. Estudos realizados por estes autores constataram o desempenho benéfico dos detergentes sobre as células espermáticas, favorecendo a ação dos fosfolipídeos da gema de ovo e, assim, aumentando a proteção aos espermatozóides contra choque térmico (ROTA

et al., 1999; HOLT, 2000a; PEÑA, 2000; LINDE-FORSBERG, 2000; ROTA *et al.*, 1997 e THOMAS *et al.*, 1992).

O Equex adicionado ao meio Tris-gema de ovo aumenta consideravelmente a termorresistência e reduz as alterações causadas no processo de congelamento e descongelamento. Entretanto, seu efeito protetor é maior quando o espermatozóide é exposto ao Equex imediatamente antes do congelamento do que se a exposição for durante o período de equilíbrio. STRÖM *et al.* (2000), afirmam que esta substância aumenta a capacidade de ligação dos espermatozoides pós-descongelamento à zona pelúcida de um ovócito homólogo.

PEÑA (2000), alertou para o fato de que a exposição prolongada dos espermatozoides as SDS ou às lipoproteínas da gema de ovo tratadas pelo SDS pode conferir um excesso de fluidez às membranas espermáticas indicando que seu efeito benéfico é dependente do tempo de exposição deste no meio diluidor.

O mecanismo de ação dos aminoácidos adicionados ao diluidor seria de proteger a célula reduzindo a quantidade de gelo intracelular e limitando a desidratação osmótica durante a congelação. Além disso, os aminoácidos podem auxiliar na estabilização das membranas espermáticas (PEÑA *et al.*, 1998a). Vários aminoácidos, entre eles a glicina, têm sido incluídos na preservação do sêmen (PAPA *et al.*, 1993; BALL, *et al.*, 2001; BILODEAU *et al.*, 2001). De acordo com PAPA *et al.* (1993), a ação da glicina ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que esse aminoácido participa na síntese de enzimas antioxidantes (*Glutadiona peroxidase*), inibindo a formação de radicais livres e, conseqüentemente, protegendo a membrana celular da oxidação.

Antibióticos também são acrescentados ao meio diluidor, para prevenir contaminações das amostras de sêmen, principalmente durante a manipulação do mesmo e durante o período que permanece resfriado. Os antibióticos comumente utilizados são a penicilina e a estreptomicina (LINDE-FORSBERG, 1991). A contaminação bacteriana pode afetar negativamente a fertilidade, pela própria presença de bactérias, pela produção de toxinas, por degradação dos componentes do meio, ou ainda, pela utilização de substratos metabólicos. Essa situação determina a necessidade de incorporar aos diluentes substâncias de efeito antimicrobiano (WATSON, 1995).

2.1.4 - Meios diluidores para o congelamento de sêmen canino

O uso de uma ampla variedade de meios diluidores para congelamento de sêmen canino tem sido citado. A composição correta do meio diluidor é vital para criopreservação do sêmen e deve ser determinada para cada espécie. FOOTE (1964) e FOOTE & LEONARD (1964), foram os primeiros pesquisadores a investigar a combinação e a quantidade de vários componentes dos diluidores para a preservação do sêmen de cão. Após examinar efeitos dos diferentes tampões (citrato, fosfato, glicina), a porcentagem de gema de ovo, e o pH do sêmen do cão, armazenado a 5°C, concluíram que a melhor combinação para preservar a motilidade foi 20% de gema de ovo (v/v), 1,16% de citrato de sódio, 0,75% de glicina, 1% de glicose e pH=6,6. Subseqüentemente, o uso do tris (Tris-hidroxymethyl-aminometano) repetidamente mostrou os melhores resultados de motilidade e longevidade quando as amostras foram congeladas em palhetas (OLAR *et al.*, 1989; THOMAS *et al.*, 1993).

O meio diluidor à base de TRIS, Ácido Cítrico e Glicose vem se mostrando bastante viável na refrigeração e no congelamento do sêmen canino (OLAR, 1984; ROTA, 1998; SANTOS *et al.*, 1999; STROM HOLST, 1999; PEÑA, 2000).

Existem muitos meios diluidores para o congelamento de sêmen canino, entre eles o mais usado é o Tris-citrato-20% de gema de ovo, com adição de antibióticos e glicerol (LINDE-FORSBERG, 1991), o qual possibilita motilidade espermática de 60 a 79% após o descongelamento (SILVA *et al.*, 2000; ROTA *et al.*, 1995; PEÑA *et al.*, 1998b; YILDIZ *et al.*, 2000).

SANTOS *et al.* (1999), avaliaram o efeito de cinco diferentes diluidores no congelamento do sêmen canino, sendo eles, TRIS-frutose-ácido cítrico, glicina, lactose, leite desnatado e TRIS-frutose-citrato, com a adição do glicerol em todos os casos realizada a 5°C. Estes autores concluíram que os diluidores TRIS-frutose-ácido cítrico e glicina proporcionaram melhora na motilidade retilínea progressiva e vigor espermático.

No Brasil, há trabalhos mostrando que o meio diluidor a base de água de coco oferece motilidade espermática de aproximadamente 50% após o descongelamento (CARDOSO *et al.*, 2000). Segundo CARDOSO *et al.* (2003), que usou meios diluidores a base de água de coco com três diferentes concentrações de glicerol, não existem diferenças entre esses três grupos quanto a motilidade e o vigor espermático. Porém, uma menor porcentagem de defeitos totais e secundários foram observados

com o meio de água de coco e 6% de glicerol. De qualquer maneira, os autores asseguraram que os três meios podem ser usados na criopreservação de sêmen canino com sucesso.

Existem muitos diluidores comerciais, como o Triladyl (Minitub, Tiefenbach, Alemanha), Laiciphos 478 e Biociphos W482 (IMV, França) e CLONE (Cryogenic Laboratories of New England, Inc.), alguns deles desenvolvidos especialmente para congelamento de sêmen canino. Porém, a grande desvantagem desses diluidores é que sua exata composição é desconhecida (NOTHLING *et al.*, 1995; SILVA & VERSTEGEN, 1995; FARSTAD, 1996; STRÖM *et al.*, 1997).

2.1.5 - Centrifugação do Sêmen

Os ejaculados caninos apresentam oscilações significativas de volume e concentração espermática devido, principalmente, a grandes variações de tamanho entre animais e entre as diferentes raças (CUNHA, 1998). Para que se determine um protocolo de congelamento na espécie canina, onde alguns fatores como: a concentração espermática por palhetas e a concentração de crioprotetor por célula espermática sejam constantes, faz-se necessário que esta variação de volume do ejaculado canino seja minimizada. A centrifugação é uma das formas propostas na literatura para a padronização dessas variações e manter constantes o volume e a concentração espermática sem que se verifique influência negativa sobre as células espermáticas (PAPA, 1987; LOPES & PAPA, 1998; KIRK, 2001).

Segundo HEIDRICH (1977), foi Freiberg em 1935 o pioneiro a identificar o fracionamento no ejaculado do cão. Chamou a primeira fração de uretral ou pré-espermática, a segunda, de fração rica em espermatozoides e a terceira de fração prostática ou pós-espermática. A incubação prolongada dos espermatozoides diluídos com a primeira e terceira frações do ejaculado, pode afetar, adversamente, a qualidade seminal. Observou-se um acentuado decréscimo na motilidade espermática em amostras de sêmen incubadas com a primeira e a terceira frações (ENGLAND & ALLEN, 1992).

Alguns experimentos de congelamento do sêmen canino, sem a eliminação da primeira e da terceira fração, têm sido propostos. Porém os dados obtidos até o presente sugerem que a utilização unicamente da fração espermática gera melhores resultados (PEÑA, 1997). A utilização da centrifugação como forma de eliminar a

primeira e a terceira fração tem sido realizada em alguns protocolos de preservação do sêmen canino (LOPES & PAPA, 1998; HELD, 1997).

JASKO (1994), sugere ainda que vários diluidores podem ser utilizados para pré-diluir o sêmen durante a centrifugação e que este passo garante uma boa proteção à célula espermática durante este processo. O mesmo autor sugere a utilização de um meio diluidor à base de leite desnatado para a realização de tal procedimento em eqüinos.

Os efeitos do processo de centrifugação sobre o sêmen canino foram testados e observou-se que a qualidade seminal das amostras de sêmen que foram centrifugadas foi superior às amostras não centrifugadas. Os parâmetros observados foram motilidade e vigor espermáticos e o resultado foi similar para todos os meios diluidores acrescentados ao sêmen e com a centrifugação sendo realizada por 15 minutos a 800g (CUNHA & LOPES, 1999).

A utilização da centrifugação do sêmen canino é uma das etapas do processo de criopreservação que vem a ser preservado, sendo citada em vários trabalhos, variando somente o tempo e a intensidade da centrifugação (OLAR *et al.*, 1989; THOMAS *et al.*, 1993; ROTA *et al.* 1995, GOVETTE *et al.*, 1996; HAY *et al.* 1997; LINDE-FORSBERG *et al.*, 1999; ROTA *et al.*, 1999).

2.1.6 - Períodos de Resfriamento e Equilíbrio do Sêmen

O resfriamento proporciona a célula um estado de quiescência, diminuindo o metabolismo e proporcionando uma diminuição nos gastos energéticos e na produção de catabólitos tóxicos. Assim, contribui para a preservação celular a partir das interações com os componentes do meio diluidor antes do estresse do congelamento, diminuindo, dessa forma, os riscos de um choque térmico. O período de equilíbrio ideal pode variar para cada espécie animal e para cada diluidor utilizado (CHACUR, 1996).

As células espermáticas de diversas espécies exigem um período de tempo de algumas horas antes de serem congeladas para adquirirem resistência máxima aos efeitos da baixa temperatura. Entretanto, este período de equilíbrio ainda não está definido para o sêmen canino (ENGLAND, 1993). Em geral, sugere-se um intervalo de uma a duas horas para a queda da temperatura de 37°C para 5 ou 4°C e o mesmo período para o equilíbrio (SEAGER *et al.*, 1975; OLAR *et al.*, 1989; WATSON,

1995; SILVA & VERSTEGEN, 1995; YILDIZ *et al.*, 2000; CUNHA & LOPES, 2001).

2.1.7 - Criopreservação dos gametas masculinos

Os crioprotetores são essenciais para a criopreservação da maioria dos sistemas biológicos. Esses aditivos, no entanto, não permitem a sobrevivência de 100% das células, o que pode ser explicado, por possuírem efeitos tóxicos sobre a célula que depende, principalmente, da concentração utilizada do agente. (FAHY, 1986).

WATSON (1995), afirmou que as mudanças pós-ejaculatórias do espermatozóide no trato feminino em sua preparação para a fusão com o oócito devem ser vistas como a continuidade no desenvolvimento e maturação espermática, processo este que teve início no epidídimo. A criopreservação implica em uma pausa neste processo natural durante a qual o espermatozóide é “inativado” ao invés de ser “reativado” no estágio de onde tinha parado, afetando assim o processo de maturação.

O processo de criopreservação faz com que os espermatozoides se tornem mais reativos pelo fato de suas membranas sofrerem mudanças na fluidez e tornarem-se mais permeáveis ao cálcio. Estes fenômenos podem promover a capacitação e reação do acrossoma, diminuindo o tempo de vida útil do espermatozóide, impossibilitando a futura fecundação do óvulo no local e momento apropriado (WATSON, 1995).

Os crioprotetores devem ser substâncias de baixo peso molecular e de baixa toxicidade. Estes agentes devem agir promovendo a diminuição gradual da concentração de eletrólitos do meio extracelular, protegendo a célula do efeito de solução durante a congelação, e possibilitando a saída gradual de água intracelular, permitindo a estabilização das membranas celulares (ALLER *et al.*, 1995).

É importante salientar que a curva de congelamento ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides se desidratem e, rápida o bastante para evitar que os espermatozoides fiquem expostos por muito tempo às altas concentrações de soluto (SNOECK, 2003).

A eficácia e praticidade de um grande número de crioprotetores permeáveis ou não às células que diminuem a formação e o tamanho dos cristais de gelo

intracelulares, têm sido testados quanto a sua utilização no resfriamento de células espermáticas (DE LEEUW *et al.*,1993).

Os crioprotetores permeantes atuam por meio de suas propriedades coligativas, diminuindo o ponto crioscópico intracelular. Desta forma, maior quantidade de água vai permanecer no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos proporcionando, assim, um ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento (WATSON, 1995).

Já os crioprotetores não permeantes protegem as células por meio de efeitos osmóticos. Essas substâncias criam um meio hipertônico que induz a saída de água do meio intracelular para o extracelular, causando a desidratação do espermatozóide reduzindo assim, a probabilidade de formação de cristais de gelo dentro da célula espermática durante o congelamento (DALIMATA & GRAHAM, 1997).

O glicerol, juntamente com outras pequenas moléculas como o metanol, etilenoglicol, 1,2-propanodiol, butanodiol, Dimetilsulfóxido e as amidas são crioprotetores que penetram na célula. Entretanto, grandes moléculas presentes no leite, gema de ovo, açúcares e nos polímeros sintéticos são classificados como crioprotetores não-permeantes (HOLT, 2000).

DALIMATA & GRAHAM (1997), observaram que o uso combinado de diversos crioprotetores pode oferecer maior proteção que seu uso isolado. Além disso, alguns podem favorecer a ação de outros.

2.1.8 - Os crioprotetores do sêmen

O agente crioprotetor mais usado é o glicerol, sendo este um álcool polihídrico altamente permeável. É classificado como um soluto que se liga fortemente aos íons de hidrogênio na molécula da água. Sua atividade crioprotetora é considerada eficiente, pois torna mais lenta a desidratação osmótica da célula durante o congelamento, permitindo a regulação do fluxo de água para a célula espermática controlando desta forma, a desidratação e minimizando o efeito de solução, que é um dos pontos críticos do processo de congelamento celular (PEÑA, 1997; DOEBBLER, 1966).

Apesar do efeito protetor, o glicerol é tóxico e sua concentração no meio diluidor deve estar entre a mínima necessária para promover proteção e a máxima

permitida para não causar danos aos espermatozóides (COTORELLO & HENRY, 2002).

A concentração ótima do glicerol varia com o diluidor, com o método de congelamento e com a espécie animal em questão (FOOTE & LEONARD, 1964; ENGLAND, 1992 citado por FARSTAD, 1996). ALLER *et al.* (1995) afirmaram que a toxicidade desse agente é dependente da temperatura do meio e a redução da temperatura durante a congelação, uma vez que anula o seu efeito tóxico.

No congelamento do sêmen canino o glicerol é o agente crioprotetor mais utilizado. A concentração deste agente nesta espécie é de 3 a 11%, porém, altas taxas dessa substância tendem a uma toxicidade sobre as células espermáticas, afetando a capacidade fecundante das mesmas (FOOTE & LEONARD, 1964; ENGLAND, 1993; FARSTAD, 1996). Nas concentrações de 8 e 5% de glicerol foram observadas as melhores qualidades espermáticas, levando em consideração a integridade do acrossoma e a longevidade dos gametas (PEÑA *et al.*, 1998b; ROTA, 1998).

FONTBONNE & BADINAND (1993) observaram os efeitos do glicerol sobre a motilidade espermática do sêmen canino, após o congelamento, variando a concentração utilizada do agente. Dessa forma a concentração mínima de glicerol, que irá conferir proteção aos espermatozóides de cães deve estar entre 1,6 e 3,2%. Também, OLAR (1989), em experimentos, observou que a utilização de crescentes concentrações de glicerol resulta em diferentes resultados quanto a motilidade e vigor espermáticos na espécie canina. Segundo FARSTAD (1996), a concentração de glicerol ideal para a sobrevivência do espermatozóide é espécie dependente.

SANTOS *et al.* (2003), ao avaliarem a eficácia de diferentes concentrações do glicerol (4%, 6%, 8% e 10%) na criopreservação do sêmen de cães, observaram melhores resultados no pós-descongelamento quanto à motilidade espermática mediante a concentração de 8%. Esse resultado corrobora com os observados pelos respectivos autores MIES FILHO (1987), FARSTAD (1996) e PENA *et al.* (1998).

SANTOS *et al.* (2001), comparando a eficiência dos crioprotetores glicerol e etileno-glicol na concentração de 5%, observaram superioridade nos resultados apresentados pelo etileno-glicol mostrando tendência do mesmo em preservar a estrutura normal dos espermatozóides após o descongelamento devido ao seu maior coeficiente de permeabilidade. Em contrapartida, CAVALCANTI *et al.* (2002), ao comparar eficiência dos mesmos crioprotetores testados por SANTOS *et al.* (2001),

porém na concentração de 7% em meio base Tris-gema, observou superioridade nos resultados quanto a viabilidade espermática com a utilização do glicerol.

Em sua revisão, SALISBURY & VANDEMARK (1978), afirmaram que os danos espermáticos são maiores quando a temperatura de exposição ao glicerol é maior que 5°C. Os mesmos autores verificaram ainda que a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozóides bovinos pós-descongelamento aumentaram quando existe um intervalo entre a adição do glicerol e o início do congelamento, e que esta etapa pode ser chamada de período de equilíbrio. No entanto, ROHLOFF (1978), não encontrou diferença entre a adição de um diluente glicerolizado ao sêmen canino a 25 ou a 5°C.

FONTBONNE & BADINAND (1993), concluíram que o método de adição e a temperatura de glicerolização adicionado ao meio em única etapa ou em várias e, tanto à temperatura ambiente, quanto a 5°C, não interferiu na qualidade espermática; o agente pode ser adicionado ao meio diluidor à temperatura ambiente e em etapa única, o que facilita o processamento do sêmen.

As amidas são moléculas que tem três pontos a menos de ligação ao hidrogênio que o glicerol. Esta característica torna-as menos solúveis em água que o glicerol e menos viscosas, resultando em uma menor permeabilidade à membrana (NASH, 1966). Esta característica pode diminuir a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causado por outros crioprotetores (BALL, 2001).

As amidas, tal como a formamida, a acetamida e a lactamida, são agentes crioprotetores permeantes que promovem bons resultados, quando utilizadas na preservação de espermatozóides de bovinos, eqüinos, suínos (exceto formamida) e coelhos, durante o processo de resfriamento e congelamento (HANADA & NAGASE, 1980; DALIMATA & GRAHAM, 1997; KEITH, 1998; SNOECK *et al.*, 2001).

No entanto, GONZALES (2004), avaliando a eficácia de diferentes crioprotetores (glicerol, etilenoglicol e dimetil-formamida), no congelamento do sêmen de bovinos, observou que o glicerol e o etilenoglicol foram superiores na preservação da viabilidade na célula espermática quando comparado a Dimetil-formamida.

Em eqüinos os resultados usando amidas como crioprotetores em sêmen também têm sido promissores. KEITH (1998), comparou vários tipos de amidas (formamida, metilformamida, dimetil-formamida, acetamida e metilacetamida) com

o glicerol para a congelação de sêmen de garanhões, encontrando superioridade da metilformamida a 0,9 M em relação ao glicerol a 0,55 M para a motilidade total e para a motilidade no tempo zero ($P < 0,05$). No tempo 20 minutos pós-descongelamento a metil-formamida 0,6 M também foi superior ao glicerol a 0,55 M para a motilidade total, motilidade progressiva e preservação da viabilidade celular determinadas pelas sondas PI e SYBR – 14 ($P < 0,05$).

SILVA (2004), utilizando a Dimetil-formamida associada ou não ao glicerol (leite desnatado-gema com 7% de glicerol; leite desnatado-gema com 3,5% de glicerol e 3,5% de dimetil-formamida e leite desnatado-gema com 5% de Dimetil-formamida) na criopreservação do sêmen caprino, a autora conclui que, a Dimetil-formamida pode ser uma alternativa, como crioprotetor isolado ao associado ao glicerol, mantendo a qualidade espermática caprina, após a criopreservação.

GRAHAM (2000), comparando os crioprotetores acetamida, metilacetamida, formamida, metilformamida e dimetil-formamida na concentração a 0,55 M, observou que os resultados de motilidade pós-descongelamento foram inferiores ao glicerol ($P < 0,05$). Em um segundo experimento, esses autores testaram metilformamida e dimetil-formamida em concentrações maiores (0,6 e 0,9 M) comparando com etilenoglicol e glicerol e, obtiveram melhor resultado com a Dimetilformamida a 0,9 M ($P < 0,05$) para motilidade, do que por outros tratamentos na espécie equina.

VIDAMENT *et al.* (2002), avaliaram o efeito de concentrações crescentes de glicerol e dimetil-formamida sobre a motilidade e fertilidade do espermatozóide eqüino e observaram que a dimetil-formamida a 2% foi tão eficiente quanto o glicerol (2 a 3%) em manter a motilidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides eqüinos. Porém, MEDEIROS *et al.* (2002), estudando o efeito de três amidas (dimetil-formamida, metil-formamida e dimetil-acetamida) sobre o sêmen eqüino congelado, observaram que as amidas foram mais eficientes em proteger os espermatozoides dos efeitos deletérios do congelamento quando comparadas ao glicerol, superioridade também observada na preservação do sêmen de garanhões considerados de baixa congelabilidade (GOMES *et al.*, 2002). As amidas aparecem como alternativas de crioprotetores no congelamento do sêmen, uma vez que não apresentam efeitos tão tóxicos quanto o glicerol (BLANCO *et al.*, 2000).

SANTOS (2003), testando diferentes diluidores (tris-gema com 5% de etilenoglicol, lactose gema com 5% de etilenoglicol e lactose gema com 5% de dimetil-formamida) na congelação do sêmen da espécie canina, observou melhores resultados nos testes “*in vitro*”, quando utilizou lactose gema com 5% de etilenoglicol, porém o crioprotetor dimetil-formamida a 5% associado ao meio lactose gema, apresentou resultado satisfatório para ser utilizado como alternativa na congelação do sêmen dessa espécie.

Os di e trissacarídeos, não metabolizáveis pelos espermatozóides, exercem ainda um efeito crioprotetor em função de seu alto peso molecular, contribuindo para o equilíbrio osmótico atuando como substitutos de eletrólito. Não possuem capacidade de penetrar a membrana quando a concentração de solutos é elevada e dão melhores resultados quando acrescidos à fração glicerolizada do extensor (SALISBURY & VANDEMARK, 1978).

Além de suas propriedades coligativas, os açúcares exercem efeito crioprotetor interagindo diretamente com a membrana. Estas interações envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com o grupo fosfato localizados na cabeça dos fosfolipídios. Por restaurar o percentual de água ao redor dos grupos polares da cabeça dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema que pode ocorrer com a congelação (HOLT, 2000). Geralmente, os dissacarídeos (sucrose, trealose) são mais efetivos em estabilizar a bicamada do que os monossacarídeos (DE LEEUW, 1993).

2.1.9 - Curva de congelação espermática

Cada tipo celular possui uma curva de congelamento ótima para sobreviver à criopreservação (WATSON, 1995). Para melhor controle nas mudanças de temperatura e taxas de congelamento de maior repetibilidade, com sêmen canino congelado, o emprego de um freezer programável é recomendado (ROTA *et al.*, 1995).

É importante salientar que a curva de congelamento ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozóides se desidratem de forma rápida o bastante para evitar que fiquem expostos por muito tempo às altas concentrações de soluto (SNOECK, 2003).

DOBRINSKI *et al.* (1993), avaliaram o efeito de três taxas de congelamento sobre a viabilidade do sêmen canino, que foi diluído com quatro meios (Tris, Triladyl, IMV-Universal e Pipes). A motilidade espermática mais elevada (33%), após o descongelamento, foi observada com a taxa de resfriamento lenta (-5,1°C/min de 3 até -157°C), obtida colocando-se as palhetas 20 centímetros acima do nível do nitrogênio líquido, por 30 minutos.

HAY *et al.* (1997), testaram cinco taxas de congelamento, obtidas por diferentes métodos (*freezer* programável ou vapor de nitrogênio líquido), em um estudo sobre criopreservação do sêmen canino. Os melhores resultados, no que diz respeito à motilidade e vigor espermáticos e integridade de acrossoma após o descongelamento, foram observados com as taxas de -12 e -28°C/minuto, iniciando em 0 até -70°C.

Segundo ROTA *et al.* (1998), aparentemente, existe uma grande amplitude nas taxas de congelamento que podem ser aplicadas sobre o sêmen canino. Tal fato pode explicar os resultados não consistentes sobre o assunto.

2.1.10 - Descongelamento

Um dos aspectos de maior questionamento dentro dos estudos da criopreservação é saber quando as alterações ocorrem, se durante o congelamento ou se no descongelamento. Existem evidências sugestivas de que células congeladas podem ser danificadas pelo descongelamento e este efeito tem sido atribuído, principalmente, à recristalização dos microcristais durante um descongelamento inapropriado (WATSON, 1995).

A temperatura sob a qual se descongela uma amostra de sêmen desempenha influência direta sobre a viabilidade espermática no pós-descongelamento, sendo principalmente descritas alterações no movimento espermático e na integridade das membranas (IVANOVA-KICHEVA *et al.*, 1995; WATSON, 1995; Holt, 2000; PEÑA, 2000).

ROTA *et al.* (1998), testaram duas taxas de descongelamento (38°C por 1 minuto e 70°C por 8 segundos) em sêmen canino envasado em palhetas de 0,5 mL. Observaram que o descongelamento à 70°C por 8 segundos aumentou a recuperação

e longevidade do espermatozóide durante incubação a 38°C, quando comparados à taxa lenta de descongelamento.

SNOECK *et al.* (2002), avaliaram três temperaturas de descongelamento sobre os espermatozóides eqüinos, associados a diferentes tipos de agentes crioprotetores (5% glicerol, 2,5% etileno-glicol, 3,5 e 5%, e a acetamida a 2,5%, 3,5% e 5%). Os autores observaram diferença dos resultados entre os protocolos de descongelamento testados (37°C/30"segundos, 50°C/20", 75°C/7" seguido de imersão em banho-maria a 37°C/ 5"). O protocolo de descongelamento rápido (75°C/ 7"seguido de imersão em banho-maria a 37°C/ 5") demonstrou superioridade em preservar melhor a motilidade espermática em todos os crioprotetores estudados.

BARRETO *et al.* (2002), testaram a influência de um termo-sistema de descongelamento ultra-rápido na motilidade e integridade de membranas de espermatozóides de touro. Foram observadas diferenças entre os protocolos de descongelamento testados (37°/ 3 minutos, 98°C/ 4 segundos seguido de imersão em bando maria a 37°C por 3 minutos, 98°C/ 2 segundos seguido pela manutenção da palheta em banho-maria a 5°C por dois minutos, e aquecimento final em banho maria a 37°C por 1 minuto). Dessa forma, o método de descongelamento ultra-rápido (98°C/ 4 segundos seguido de imersão em banho maria a 37°C por 3 minutos) demonstrou superioridade ao descongelamento convencional (37°/ 3 minutos) quanto a motilidade espermática progressiva.

PENÃ (2000), afirmou que a temperatura de 70°C/8", melhora os resultados de fertilidade para o sêmen de cães. Em seu experimento a autora sugeriu que o descongelamento a 37°C/15", pode expor as membranas espermáticas a variações de temperatura que induzem à reorganização de lipídeos ou à movimentação de proteínas mais severamente que as alterações ocorridas a 70°C/8".

O descongelamento sob altas temperaturas com um tempo de exposição bastante curto, tem sido preconizado para o descongelamento do sêmen de cães (OLAR, 1984; ENGLAND, 1992; IVANOVA-KICHEVA *et al.*,1995; ROTA, 1998; STROM HOLST, 1999; PEÑA, 2000) conferindo longa viabilidade às amostras de sêmen tanto *in vitro* como *in vivo*. Entretanto, YUBI (1984) e ENGLAND (1993), verificaram maior declínio na motilidade espermática e na porcentagem de espermatozóides vivos, nas amostras descongeladas por meio da taxa rápida (75°C/6"), que nas amostras descongeladas com a taxa lenta (37°C por dois minutos).

SANTOS *et al.* (2003), observaram elevado percentual de acrossoma intacto do sêmen de cães utilizando o descongelamento á temperatura de 37°C por 30 segundos. PENÃ & LINDE-FORSBERG, (2000); SODERQUIST *et al.* (1997), avaliando a integridade acrossomal de espermatozóides de carneiros descongelados a 35°C, observaram média de 67,6% de acrossomas intactos. Já, SILVA (2004), após o descongelamento de sêmen de bodes a 37°C observou 95% de acrossomas intactos.

De modo geral, o congelamento e o descongelamento devem seguir o mesmo padrão de velocidade, ou seja, quando o congelamento é realizado sob processo rápido o descongelamento também deve proceder de acordo e, quando o protocolo de congelamento for lento a descongelamento também deve ser lento (STROM *et al.*, 1997).

2.2 - Métodos de Análise do Sêmen Criopreservado

Após o processo de congelamento e descongelamento das células espermáticas, testes de alta correlação com a fertilidade devem ser realizados, para que se verifique a viabilidade dos diluidores e\ou dos métodos de congelamento utilizados (PENÃ, 2000; KIRK, 2001).

Para ser fértil, os espermatozóides devem ser capazes de expressar várias características, em uma seqüência temporal correta. Além disso, um número suficiente de espermatozóides férteis deve estar presente nas proximidades do ovócito, para a ocorrência da fecundação (AMANN & HAMMERSTEDT, 1993). A inseminação artificial com o sêmen congelado, que consiste no método de análise *in vivo*, é a melhor técnica para se avaliar se os espermatozóides criopreservados mantiveram essas características e, conseqüentemente, seu potencial fértil (ENGLAND, 1993).

As análises *in vivo* requerem um número grande de animais para serem avaliados e também, dependem de uma variedade de fatores que vão muito além da qualidade seminal. Entre esses fatores podem ser incluídos o número de doses e o volume de sêmen ideal para realização da inseminação, bem como o número de inseminações; o local de deposição do sêmen na fêmea; o momento ideal de inseminação, considerando-se o ciclo estral e fatores individuais dos animais (FARSTAD, 1996).

Os métodos de análise *in vitro* podem ser empregados para avaliar algumas das características que os espermatozoides férteis detêm. Quando os métodos *in vitro* são usados em conjunto, aumenta-se a acurácia em predizer o potencial de fertilidade do sêmen criopreservado. Para tal, o sêmen deve ser submetido a alguns testes específicos que avaliam, entre outras características, os seus parâmetros físicos, integridade da membrana plasmática e do acrossoma e a longevidade dos espermatozoides (ROTA *et al.*, 1998; LARSSON & RODRIGUES-MARTINEZ, 2000).

2.2.1 - Análises *in vivo* da qualidade espermática do sêmen criopreservado

As características que as células espermáticas viáveis apresentam podem ser detectadas pelos métodos de análise *in vitro*, porém deve-se salientar que esses métodos *in vitro* não correspondem a mesma fidelidade dos resultados encontrados *in vivo*. Desta forma, GIL *et al.* (1970) e ANDERSERN (1972), obtiveram taxa de prenhez nula, apesar de terem observado uma motilidade espermática após o descongelamento de cerca de 50%. Contudo, AMANN (1989), afirmou que as aferições obtidas dos teste *in vitro* como a motilidade espermática, condição de acrossoma e outras características do sêmen estão significativamente correlacionadas com a fertilidade.

2.2.2 - Análises *in vitro* da qualidade espermática do sêmen criopreservado

As análises *in vitro* do sêmen devem avaliar a função espermática, predizendo se a célula espermática está apta ou não para realizar a fecundação do ovócito, mimetizando a situação *in vivo* no aparelho genital da fêmea. Para tal, o sêmen deve ser submetido a alguns testes específicos que avaliem, entre outras características, os seus parâmetros físicos, a integridade da membrana plasmática e do acrossoma e a longevidade do espermatozoide. Entre os testes indicados, está a avaliação da motilidade progressiva e do vigor espermático, o teste hiposmótico, a técnica de coloração por fluorescência e o teste de termorresistência. Observou-se que estes testes, quando correlacionados com fertilidade, apresentaram resultados satisfatórios (ROTA, 1998).

A motilidade e o vigor espermáticos foram, durante muito tempo, os únicos parâmetros empregados para a avaliação da integridade dos espermatozóides, como pode ser observado em diversos trabalhos (OLAR *et al.*, 1989; DOBRINSKI *et al.*, 1993; THOMAS *et al.*, 1993). Porém, apesar de serem uma expressão da viabilidade espermática, seus valores também dependem do ambiente em que os espermatozóides são colocados para serem observados e nem sempre correspondem, diretamente, com a capacidade fecundante do sêmen (ROTA, 1998).

A avaliação subjetiva da motilidade e do vigor é utilizada para estimar o percentual de espermatozóides móveis e viáveis, visto que, os gametas masculinos precisam obter hiper-atividade quando na tuba uterina, para alcançar o ovócito e penetrar nas suas camadas de revestimento (AMANN, 1989; ZÚCCARI, 1998). Entretanto, para ENGLAND (1993), os espermatozóides podem apresentar motilidade espermática elevada após o congelamento, mesmo não sendo férteis. Isto ocorreria devido a defeitos em outras estruturas, como o acrossoma e, desse modo, seriam necessárias outras análises do sêmen.

Métodos identificadores da integridade das membranas espermáticas têm sido utilizados na avaliação de diferentes técnicas de conservação do sêmen (BLACH *et al.*, 1989; HARRISON & VICKERS, 1990; KUMI-DIAKA, 1993; PEÑA, 2000; KIRK, 2001).

Segundo JEYENDRAN *et al.* (1984), o teste hipo-osmótico é bastante eficaz na avaliação da integridade funcional da membrana plasmática e consiste na ocorrência de um influxo de uma solução hipo-osmótica através da membrana, provocando um aumento de volume na tentativa do espermatozóide equilibrar os meios extra e intracelular. Esta turgescência, principalmente na região da cauda, resulta no enrolamento desta área e esta alteração é facilmente visualizada em microscópio de contraste de fase. O teste hipo-osmótico também foi usado em sêmen de cães por KUMI-DIAKA (1993); ENGLAND & PLUMMER (1993) e RODRIGUEZ-GIL *et al.* (1994), e concluiu-se que esse teste é útil para identificar machos sub-férteis e para selecionar sêmen preservado para inseminação artificial. O uso do teste hiposmótico (HO) tem sido descrito em diversas espécies, principalmente em humanos (JEYEDRAN *et al.*, 1984).

KUMI-DIAKA (1993) utilizou o teste hipo-osmótico no sêmen de cães, para determinar a resposta dos espermatozóides ao teste. Foram testadas diferentes soluções hipo-osmóticas e a recomendada foi a de 60 mOsm de frutose, após 45

minutos de incubação do sêmen nessa solução. Nessas condições, encontrou-se o número máximo de espermatozóides com a cauda enrolada. A porcentagem de espermatozóides com a cauda enrolada foi de 77,7% nas amostras de sêmen fresco, 78,7% após o resfriamento por 24 horas a 5°C, 11,4% após o aquecimento a 50°C por 2 horas e 56,7% após o descongelamento.

Durante a realização do teste hipo-osmótico, vários autores observaram que nem todos os espermatozóides respondiam com a mesma intensidade ao teste, podendo ser devido ao grau de alterações da membrana plasmática (JEYENDRAN *et al.*, 1984; ZAVOS, 1991; JEYENDRAN *et al.*, 1992; ENGLAND & PONZIO, 1993; KUMI-DIAKA, 1993; RODRIGUEZ-GIL *et al.*, 1994; HOSSAIN *et al.*, 1998; NEILD *et al.*, 1999). Diferentes tipos de enrolamento de cauda puderam ser observados, incluindo desde uma pequena curvatura na ponta da cauda até cauda fortemente enrolada, com vários enrolamentos intermediários. Acredita-se que os filamentos do axonema da cauda podem sofrer flexões de graus diferentes, conforme a quantidade de água que entrou na célula.

Outra análise *in vitro* do sêmen, considerada imprescindível para se avaliar a qualidade espermática é a de integridade do acrossoma (YANAGINACHI, 1994). Segundo STROM *et al.* (1997), a membrana plasmática e a região acrossomal são as regiões mais atingidas durante o congelamento e descongelamento. A desestabilização das membranas após o congelamento ou criopreservação pode levar a reação acrossômica prematura (MARSHBURN *et al.*, 1992). A reação acrossômica é o estágio seguinte à capacitação e, tem como função básica, permitir que os espermatozóides penetrem na zona pelúcida, fundindo-se à membrana do ovócito (YANAGINACHI, 1994). Como as membranas acrossomais podem sofrer lesões durante o processamento do sêmen, faz-se necessário à avaliação de sua integridade para predizer a qualidade do sêmen preservado (CROSS & MEIZEL, 1989).

CROSS & MEIZEL (1989), salientaram que existem diferentes métodos que podem ser empregados para a avaliação do acrossoma espermático, como microscopia de contraste de fase, colorações específicas para visualização do acrossoma, em microscopia ótica convencional e marcadores fluorescentes, sendo que cada um dos métodos apresenta fatores positivos e negativos.

Segundo CUNHA (1997), uma outra alternativa para avaliar a integridade das membranas espermáticas é o uso de sondas fluorescentes, sendo elas o diacetato de

carboxifluoresceína (FDA) e o iodeto de propídeo (PI). O FDA, um éster não polar e não fluorescente, atravessa a membrana plasmática e é hidrolisado por esterases não específicas, resultando na formação de 6-carboxifluoresceína, composto impermeável à membrana plasmática, que emite fluorescência verde nos compartimentos celulares onde há integridade de membranas. Ao contrário, o PI, possui forte afinidade aos ácidos nucleicos, sendo impermeável à membrana plasmática. Portanto, as células que apresentarem a membrana plasmática lesada, permitiram a interação do PI com o DNA presente no núcleo da célula, proporcionando dessa forma, a emissão de uma fluorescência vermelha.

A microscopia de contraste de fase permite a visualização do acrossoma, em diversas etapas da reação acrossômica e também a identificação das alterações mais comuns, que podem ocorrer durante o processamento do sêmen. Porém, na espécie canina a visualização pode ser relativamente difícil, devido ao reduzido tamanho da cabeça dos espermatozoides (CROSS & MEIZEL, 1989).

ROTA (1998), avaliou a integridade de acrossoma após a criopreservação do sêmen de cão, pela coloração com o corante comercial Spermac e observou o acrossoma em microscopia ótica convencional. Relatou que cerca de 45% dos espermatozoides apresentavam algum tipo de alteração secundária, representando diferentes estágios de degeneração acrossomal. Segundo o autor, mesmo que o processo de criopreservação do sêmen cause lesões secundárias no acrossoma, não se pode excluir a possibilidade de que, se essas lesões fossem pequenas, os espermatozoides poderiam manter sua capacidade fecundante.

Os testes de termo-resistência adquiriram grande aceitação, uma vez que o sêmen é submetido à condição de temperatura semelhante à que fica exposto no trato genital das fêmeas em estro, dando uma idéia de resistência do sêmen pós-inseminação (BARNABE *et al.*, 1981). Entretanto, segundo estes mesmos autores, o teste de resistência lento é uma prova demasiadamente rígida para a avaliação de amostras de sêmen.

O teste de termo-resistência tem sido utilizado em diversos trabalhos, como um incremento na avaliação da qualidade espermática do sêmen criopreservado. De modo geral, as amostras de sêmen são submetidas a períodos de duas a seis horas de incubação, nas temperaturas de 37 a 39°C (THOMAS *et al.*, 1992; FONTBONNE e BADINAND, 1993; ENGLAND & PONZIO, 1996; HAY *et al.*, 1997; PEÑA *et al.*, 1998a; PEÑA *et al.*, 1998b; ROTA *et al.*, 1999).

PEÑA *et al.* (1998a) estudando a longevidade do sêmen de cães congelado e diluído com Tris-gema de ovo e 4% de glicerol, observaram que a motilidade espermática, imediatamente após o descongelamento, foi de 40,4%. Nos momentos subseqüentes de observação, os valores encontrados foram de 25,4% aos 30 minutos, 21% aos 60 minutos e 13% aos 120 minutos, após o descongelamento.

Os autores THOMAS *et al.* (1992) e HAY *et al.* (1997), observaram motilidade entre 30 a 50%, após duas horas de incubação do sêmen diluído em meio Tris-citrato-gema de ovo. ROTA *et al.*, (1999) utilizando o diluente Tris-citrato-glicose com 5% de glicerol, observou motilidade espermática após o descongelamento a 47%, seguida de 21%, 17% e 14%, em uma, duas e três horas de incubação, respectivamente. Essas mesmas amostras de sêmen foram utilizadas para a inseminação em cadelas e as taxas de prenhez obtidas foram de 84% (ROTA *et al.*, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados três cães, clinicamente saudáveis, com idade entre dois e quatro anos, da raça Labrador do Retriever, todos provenientes de proprietários da cidade de Viçosa, MG. Os animais foram mantidos, durante todo o procedimento experimental, sob condições normais de manejo alimentar com ração comercial disponível uma vez ao dia e livre acesso à água. Os cães foram submetidos a exame andrológico prévio, sendo analisados os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen e todos estavam dentro do padrão considerado normal para a espécie (FELDMAN & NELSON, 1996).

As coletas de sêmen foram realizadas no Laboratório de Reprodução do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em intervalos semanais, através de manipulação digital, totalizando cinco coletas para cada macho. Para a coleta foram utilizados tubos de centrifuga graduados, acoplados a funil de plástico, ambos acondicionados dentro de um recipiente de isopor, contendo água a 37°C e mantidos nesse recipiente durante a coleta. Todo o ejaculado coletado imediatamente após o término da ejaculação, foi incubado a 37°C, em banho-maria com controle digital¹.

Imediatamente após a coleta, foram registrados o volume, a concentração, a motilidade e o vigor espermáticos. O volume do ejaculado foi verificado por visualização direta do sêmen no tubo de centrifuga graduado e registrado em mililitros (mL).

¹ Tecnal

A mensuração da concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se sêmen diluído na proporção de 20 μ L em 4,0mL de solução de formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957). O número total de espermatozóides no ejaculado foi obtido multiplicando-se o volume de sêmen ejaculado, pela concentração espermática, ambos em mililitros (FELDMAN & NELSON, 1996).

Uma alíquota de 20 μ L de sêmen foi colocada em uma lâmina de vidro, coberta com uma lamínula, ambas mantidas à temperatura de 37°C, em placa aquecedora, para a observação da motilidade progressiva dos espermatozóides, realizada em microscopia óptica de contraste de fase², em aumento de 200 vezes, e registrada em dados percentuais. A determinação da intensidade do movimento dos espermatozóides (vigor) foi em microscopia óptica de contraste de fase com aumento de 200 vezes, atribuindo-se escala de 0 a 5 entre os valores mínimos e máximos observados, respectivamente (CBRA, 1998).

Após as coletas, alíquotas de sêmen foram acondicionadas em um frasco contendo (1mL) formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957), permanecendo aquecidos a 37°C, e posteriormente estocadas em temperatura ambiente até o dia da avaliação da morfologia dos espermatozóides, pelo método de preparação úmida. Esse método consistiu na colocação de uma gota sobre uma lâmina limpa e seca, cobrindo-a com uma lamínula. Foi aplicado sobre este conjunto um papel filtro pressionando-se suavemente com objetivo de absorção de excesso de líquido. A avaliação foi realizada em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x sob objetiva de imersão. Foram avaliadas 200 células por amostra de ejaculado e o resultado foi expresso em porcentagem de defeitos maiores, menores e totais.

Após a avaliação, o sêmen obtido de cada ejaculado foi dividido em três frações iguais, sendo cada uma delas pré-diluída na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor), sendo que a primeira diluição foi utilizada a solução de Ringer com Lactato a 37°C. Após a pré-diluição, o sêmen foi centrifugado por dez minutos a 650 G, para retirada do líquido seminal e padronização das amostras.

Após a centrifugação e retirada do líquido sobrenadante, as amostras de sêmen foram diluídas com os meios diluidores (T1), (T2) e (T3), todos a base de tris-citrato (ROTA *et al.*, 1995): (T1) (tris-citrato modificado/ = 3% dimetil-formamida + 3% glicerol), (T2) (tris-citrato modificado/ = 3% dimetil-formamida +3% trealose) e

² Olympus - CBA

(T3) tris-citrato (glicerol) (Tabela 1). Dessa forma, todos os diluentes estavam na temperatura de 37°C e o volume do diluidor acrescentado foi suficiente, para o ajuste da concentração total de espermatozóides, de 50 milhões por mL.

Tabela 1. Composição do meio Tris-citrato, utilizado como diluente base do sêmen, nos diferentes tratamentos (T1, T2, e T3).

Diluidor	T1	T2	T3
Tris (g)	3,025	3,025	3,025
Ácido Cítrico (g)	1,70	1,70	1,70
Frutose (g)	1,25	1,25	1,25
Gema de ovo %	20	20	20
Estreptomicina (mg/l)	1	1	1
Glicerol (mL)	3		4
Dimetil-formamida (mL)	3	3	-
Trealose (g)	-	3	-
Água Destilada - qsp (mL)	100	100	100

O sêmen foi envasado imediatamente após a diluição em palhetas de plástico de 0,5mL, previamente identificadas e mantidas aquecidas, as mesmas foram fechadas ao calor do fogo. Depois do envase das palhetas foi utilizado o protocolo de resfriamento e período de equilíbrio. Para o resfriamento, as palhetas contendo o sêmen foram colocadas em um frasco de vidro pré-aquecido e medindo 15 centímetros de altura e 5 cm de diâmetro, que foi sistematicamente fechado, para evitar o contato das palhetas com água. Esse frasco foi colocado dentro de um recipiente de plástico, com 20 cm de altura e 12 cm de diâmetro, contendo 1250mL de água a 37°C. Com esse procedimento, o frasco de vidro com as palhetas foi submetido ao resfriamento, em água a 37°C (BUENO 2000).

Ambos os recipientes, foram, então, acondicionados dentro de uma caixa de isopor, na qual foi deixado um espaço para acoplar o recipiente de plástico, para fixá-lo dentro da caixa de isopor, com as seguintes dimensões: 32,5 cm de altura, 2,0 cm de espessura e 30,0 cm de largura. Esta caixa foi previamente preparada com 4,0 litros de gelo e 4,0 litros de água, volume esse, pré-definido, para se atingir, de modo aproximado, a curva de resfriamento desejada (BUENO 2000).

A queda da temperatura na água em contato com o frasco que continha as palhetas foi medida, previamente, por meio de termômetro digital. Essa aferição de temperatura permitiu a definição aproximada da curva de resfriamento do sêmen, como sendo de $-0,45^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Porém, essa queda não foi contínua, durante os 60 minutos do resfriamento. Dessa forma, o resfriamento do sêmen ocorreu em cerca de 60 minutos, com temperatura inicial de 37°C , até atingir a temperatura final de 4°C . Em seguida, as amostras permaneceram por 60 minutos, a aproximadamente 4°C , na mesma caixa de isopor (período de equilíbrio) (BUENO 2000).

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas que estavam em equilíbrio a 4°C , sobre uma grade de isopor de 4 cm de altura, sobre o nitrogênio líquido, contido em uma caixa de isopor apropriada de 32,5 cm de altura e contendo 15 cm de nitrogênio líquido no seu interior. O sêmen foi pré-congelado, durante 15 minutos, no vapor de nitrogênio líquido e após esse período, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio. Logo após, as palhetas foram colocadas em *canister* apropriado e armazenadas em botijões com nitrogênio líquido. O sêmen foi mantido criopreservado até o momento de sua utilização.

No descongelamento do sêmen foram utilizados dois protocolos: protocolo de descongelamento rápido e protocolo de descongelamento lento. Onde 50% das palhetas foram descongeladas pelo processo rápido de descongelamento e os outros 50% das palhetas descongeladas pelo processo lento. No processo rápido foi utilizado o descongelamento das palhetas em banho maria a temperatura de 75°C por sete segundos, seguido de imersão em banho maria a 37°C por 1 minuto (PENA *et al.*, 1998). Enquanto que o processo lento procede com o descongelamento das palhetas em banho maria à 37°C por 1 minuto (SILVA *et al.*, 1998). Dessa forma os tratamentos T1, T2 e T3 foram descongelados pelo processo rápido enquanto que os tratamentos T4, T5, e T6 foram descongelados pelo tratamento lento. O descongelamento das amostras de sêmen foi realizado entre uma semana até, aproximadamente, um mês, após o seu congelamento.

Após o descongelamento, o sêmen, foi retirado das palhetas e transferido para frascos *ependorf* de 1,5 mL. Os frascos foram mantidos incubados a 37°C , até o momento de avaliação das amostras de sêmen.

As amostras do sêmen, diluídas de acordo com as três associações crioprotetoras sob estudo, foram avaliadas após o descongelamento. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados segundo a metodologia descrita anteriormente.

A integridade da membrana plasmática foi avaliada imediatamente após o descongelamento, por meio do teste hipo-osmótico (Teste Hiposmótico), utilizando 500µL de uma solução com frutose na concentração de 60 mOSMol, acrescida de 50µL de sêmen. Essa solução foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Após esse período, as amostras foram fixadas em 250µL de solução de formol salina tamponada, para posterior análise em microscopia de contraste de fases³. Foram avaliadas 200 células por amostra, com aumento de 1000X. As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda enrolada. O resultado foi determinado em porcentagem (KUMI-DIAKA, 1993).

A integridade estrutural da membrana plasmática e do acrossoma foi avaliada após o descongelamento pela técnica de fluorescência, adotando-se a coloração com dois fluorocromos, o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídeo (IP), segundo o protocolo proposto por HARRISON & VICKERS (1990), com as modificações citadas por ZUCCARI (1998). Estas soluções foram preparadas e armazenadas ao abrigo da luz. O volume total foi fracionado em alíquotas e acondicionadas em *eppendorf* revestidos por papel alumínio e mantidos congelados a -20°C.

As soluções de formol e citrato de sódio usadas no preparo da solução de trabalho para a realização do teste de fluorescência direta foram preparadas e armazenadas sob refrigeração a 5°C, utilizadas no período máximo de quatro dias. No dia da avaliação do sêmen descongelado as respectivas soluções eram mantidas a temperatura ambiente. As soluções dos corantes CFDA e ID também foram descongeladas até estarem a temperatura ambiente, de forma que a solução de manipulação (Anexo 1) foi preparada minutos antes do descongelamento do sêmen e ao abrigo da luz.

O sêmen diluído na solução de manipulação foi acondicionado em *eppendorf* revestidos por papel alumínio e mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente quatro horas. Foram avaliadas 100 células por amostra, ao abrigo da luz, em microscópio de fluorescência com aumento de 400X (Nikon–Episcopic

³ Olympus - BX50

Fluorescent Attachment “EFA” HalogenLamp Set), com utilização de filtros de 480 a 610 nm. A membrana plasmática e acrossomal foram avaliadas segundo a coloração apresentada pelos espermatozoides, sendo consideradas três categorias para a interpretação dos resultados (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação dos espermatozoides, quanto a integridade da membrana plasmática e acrossomal, submetidos a técnica de coloração com diacetocarboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP).

Categoria	Coloração	Características
Espermatozoide íntegro	Célula corada pelo CFDA, apresentando-se verde fluorescente em toda sua extensão	Presença de membrana plasmática íntegra
Espermatozoide lesado	Célula corada pelo IP, apresentando-se vermelha fluorescente	Presença de membrana plasmática e acrossomal lesadas
Espermatozoide semi-lesado	Célula corada pelo CFDA na região do acrossoma e núcleo corado pelo IP, apresentando acrossoma verde fluorescente e núcleo vermelho fluorescente	Presença de membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra

Fonte: SANTOS (2003).

A longevidade dos espermatozoides foi avaliada nas amostras de sêmen, por meio do teste de termo-resistência (TTR). O teste consistiu em colocar uma amostra de sêmen de 0,5mL, em um frasco *ependorf* de 1,5mL, coberto por uma película de óleo mineral, para evitar a sua evaporação. As amostras foram submetidas a incubação a 37°C, durante 2 horas e a cada 30 minutos foram avaliadas quanto à motilidade e vigor espermáticos (DIMITROPOULOS, 1967).

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochram) e posteriormente a análise de variância. Apresentando significância, foi realizado o teste de Duncan. A variável qualitativa

vigor foi submetida ao teste não-paramétrico de Kruskal- Wallis, adotando o nível de 1% (SAEG, 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físicas e morfológicas do sêmen recém ejaculado dos animais utilizados no presente experimento (Tabela 3) estão dentro da normalidade para a espécie canina (SEAGER, 1986, JOHNSTON, 1991, LINDE-FORSBERG, 1991; FELDMAN & NELSON, 1996).

Tabela 3. Características seminais médias de cães da raça Labrador do Retriever, utilizados, como doadores de sêmen para o experimento.

Características Seminais						
	Cão 01	CV	Cão 02	CV	Cão 03	CV
Volume (mL)	8,7	26,2	7,3	6,1	35,2	6,1
Motilidade (%)	82	6,9	89	7,3	87	3,1
Vigor (0-5)	3,2	8,5	3,3	8,3	3,2	8,5
Defeitos Menores (%)	4,1	91,1	3,9	33,4	1,8	30,6
Defeitos Maiores (%)	10,5	58,9	5,7	50,7	5,6	43,7
Defeitos Totais (%)	14,6	56,6	9,6	26,4	7,4	34,0

CV = Coeficiente de variação.

Foi verificada diferença entre as associações crioprotetoras testadas, de forma que, foi apresentada superioridade quanto aos parâmetros motilidade progressiva e vigor espermático das associações dimetil-formamida e glicerol; e glicerol com os respectivos tratamentos T1 e T4; e T3 e T6, comparado aos resultados inferiores

demonstrados pela associação crioprotetora dimetil-formamida e trealose (tratamentos T2 e T5).

Porém, avaliando separadamente cada associação crioprotetora, não houve diferença ao utilizar distintos protocolos de descongelamento, sendo um rápido e outro lento ($P>0,05$) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Motilidade progressiva média (%) de sêmen congelado canino com diferentes associações de crioprotetores e submetido ao teste de termorresistência (TTR) após o descongelamento.

Tratamentos	TTR (minutos)									
	0	CV	30	CV	60	CV	90	CV	120	CV
T1	70,6 ^a	17,9	43,3 ^a	38,4	22,0 ^a	33,0	10,0 ^a	50,0	2,0 ^b	207,0
T2	34,3 ^b	32,5	21,3 ^b	54,9	12,3 ^b	30,1	5,0 ^b	100,0	0,0 ^b	-
T3	67,3 ^a	21,1	45,0 ^a	32,0	25,0 ^a	36,2	14,0 ^a	38,6	8,3 ^a	62,8
T4	65,0 ^a	18,6	42,6 ^a	43,4	21,0 ^a	39,4	12,6 ^a	20,4	3,0 ^b	175,9
T5	29,0 ^b	34,0	18,0 ^b	20,5	10,0 ^b	32,7	1,3 ^b	263,9	0,0 ^b	-
T6	64,6 ^a	24,9	45,0 ^a	46,0	20,3 ^a	44,0	10,3 ^a	56,3	1,6 ^b	269,9

T1) = Dimetilformamida + Glicerol; T2) = Dimetil-formamida + Trealose; T3) = Glicerol; T4) = Dimetilformamida + Glicerol; T5) = Dimetil-formamida + Trealose; T6) = Glicerol; /T1, T2 e T3 descongelados á 75 C°/7sg/ seguido de imersão em Banho-Maria á 37 C°;/ T4, T5 e T6 descongelados á 37 C°/60sg / CV = Coeficiente de variação; Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($P<0,01$), pelo teste de Duncan.

Os resultados das amostras preservadas em dimetil-formamida associada ao glicerol (T1 e T4) apresentaram resultados satisfatórios logo após o descongelamento quanto aos parâmetros motilidade progressiva e vigor espermático. Estes resultados foram semelhantes ao encontrado por PAPA *et al.* (2003), que também verificaram bons resultados quanto a motilidade progressiva e vigor espermático no pós-descongelamento da associação dimetil-formamida e glicerol, conforme a composição do meio diluidor MP50, contudo os autores não relataram a concentração dos crioprotetores utilizados, devido ao desenvolvimento do diluente MP 50 ser uma fórmula comercial.

Tabela 5. Valores médios do vigor espermático obtidos durante o teste de termoresistência (TTR) após descongelamento, nas amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas à criopreservação com diferentes associações crioprotetoras.

Tratamento	TTR (minutos)									
	0	CV	30	CV	60	CV	90	CV	120	CV
T1	2,9 ^a	9,6	2,4 ^{a,b}	21,2	1,5 ^{a,b,c}	17,8	0,9 ^{a,b,c}	49,0	0,2 ^{a,b}	207,0
T2	2,2 ^{b,c}	18,4	1,6 ^c	33,4	1,1 ^{b,c}	26,4	0,5 ^{b,c}	100,0	0 ^b	-
T3	2,9 ^a	7,7	2,5 ^a	19,0	1,8 ^a	24,5	1,3 ^a	38,6	0,8 ^a	62,8
T4	2,9 ^a	11,6	2,3 ^{a,b}	20,3	1,6 ^{a,b}	18,2	1,1 ^{a,b}	20,4	0,2 ^{a,b}	175,9
T5	2,0 ^c	19,6	1,6 ^{b,c}	18,2	1,0 ^c	32,7	0,1 ^c	263,9	0 ^b	-
T6	2,8 ^{a,b}	10,9	2,2 ^{a,b,c}	23,7	1,5 ^{a,b}	23,7	0,9 ^{a,b}	56,3	0,1 ^{a,b}	269,2

T1) = Dimetilformamida + Glicerol; T2) = Dimetil-formamida + Trealose; T3) = Glicerol; T4) = Dimetilformamida + Glicerol; T5) = Dimetil-formamida + Trealose; T6) = Glicerol; /T1, T2 e T3 descongelados á 75 C°/7sg/ seguido de imersão em Banho-Maria á 37 C°;/ T4, T5 e T6 descongelados á 37 C°/60sg / CV = Coeficiente de variação Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si (P<0,01), pelo teste de Kruskal-Wallis.

A concentração de dimetil-formamida utilizada neste experimento foi escolhida com base nos valores, com os quais esse crioprotetor vem sendo utilizado para outras espécies. MEDEIROS *et al.* (2002) e GOMES *et al.* (2002), observaram na espécie eqüina, superioridade dos resultados apresentados com a utilização da dimetil-formamida a 5% para a preservação espermática. Entretanto, VIDAMENT *et al.*, (2002) observaram decréscimo na vitalidade do sêmen eqüino com a utilização de dimetil-formamida a 5%, sendo que a concentração de 2% apresentou melhores resultados. SILVA (2004), observou na espécie caprina, que a dimetil-formamida nas com nas concentrações de 3,5 e 5% pode ser uma alternativa como agente crioprotetor, pois manteve a qualidade espermática após a criopreservação. Esses resultados demonstraram a necessidade de estudos sobre as diferentes concentrações de dimetil-formamida para a criopreservação espermática, levando-se em consideração a espécie estudada.

Ainda quanto aos parâmetros motilidade progressiva e vigor espermático, os tratamentos (T3 e T6) os quais continham o glicerol como agente crioprotetor, também apresentaram resultados satisfatórios de 67,3 e 64,6% respectivamente, logo após o descongelamento, de acordo com as Tabelas 4 e 5, demonstrando semelhança

quanto a motilidade progressiva comparado aos resultados apresentados por BUENO (2000), (64%) referente ao respectivo meio.

Diversos trabalhos têm empregado o tris-citrato, com resultados próximos aos observados no presente experimento (THOMAS *et al.*, 1993; STROM *et al.*, 1997; ROTA *et al.*, 1998). Segundo RODRIGUES (1997), o tris (tris-hidroximetilaminometano) têm sido utilizado na espécie canina com maior frequência por conter agente emulsificante em sua composição, prevenir a acidose do meio diluente, além de contribuir na preservação da energia espermática reduzindo os índices de frutólise.

Os piores resultados apresentados por este experimento quanto ao parâmetro motilidade progressiva e vigor espermático no pós-descongelamento foram verificados com a associação da dimetil-formamida e a trealose, (T2 e T5) de acordo com as Tabelas 4 e 5. Contudo essa variação pode ter ocorrido devido à utilização do agente crioprotetor Trealose, pois os resultados demonstrados pela dimetil-formamida associada ao Glicerol (T1 e T4) foram superiores aos apresentados pelos tratamentos T2 e T5.

Da mesma forma, BORDIGNON *et al.* (1996), não obtiveram bons resultados na criopreservação do sêmen suíno, utilizando a Trealose como agente crioprotetor. O fato discutido pelo autor é o desconhecimento das mudanças que ocorrem quando o crioprotetor trealose está associado aos demais ingredientes do diluente. Os fosfolípidos presentes na gema de ovo e substâncias como o cálcio presentes no meio diluidor, demonstram uma afinidade pela mesma molécula de membrana espermática que o crioprotetor trealose (PAQUIGNON, 1985). Assim, as chances de ocorrer uma interação do crioprotetor Trealose com as moléculas de membrana espermática ficam menores, além da proporção desigual de 20% de gema de ovo comparado a 3% de trealose, diminuindo dessa forma a eficácia da mesma como agente crioprotetor.

Os resultados inferiores quanto aos parâmetros motilidade progressiva e vigor espermático apresentados pelos tratamentos T2 e T5 respectivo à associação dimetil-formamida + trealose deve ter ocorrido possivelmente pela ausência de interação entre os mesmos agentes crioprotetores durante o processo de criopreservação.

YILDIZ *et al.* (2000), verificaram a inferioridade do dissacarídeo (trealose) e superioridade do monossacarídeo (frutose) quanto a motilidade progressiva na espécie canina. Segundo BARTLLET (1962), os espermatozóides da espécie canina

são capazes de utilizar eficientemente a frutose como fonte de energia, a despeito de possuí-la em baixas concentrações no plasma seminal.

Um dos fatores que limita a fertilidade do sêmen criopreservado é o período de sobrevivência deste após o descongelamento, que pode ser avaliado pelo teste de termo-resistência lento (TTR). O TTR lento foi utilizado neste experimento, mimetizando assim à temperatura em que o espermatozóide ficaria exposto no trato genital da fêmea em estro após uma inseminação artificial (BARNABÉ *et al.*, 1981). Dessa forma, foi possível observar a resistência espermática durante o teste, por meio da avaliação da motilidade progressiva e vigor espermático (ZUCCARI, 1998).

Os tratamentos T1 e T4 (dimetil-formamida e glicerol) e T3 e T6 (glicerol) demonstraram resultados semelhantes e satisfatórios quanto a motilidade progressiva até aos 90 minutos do TTR lento. Porém, aos 120 minutos do respectivo teste, houve superioridade do tratamento T3 ($P < 0,01$) (Tabela 4). Provavelmente a superioridade do tratamento T3 na manutenção da viabilidade espermática canina, pode ter ocorrido devido à interação do tipo e concentração crioprotetora utilizada (glicerol à 4%), associado ao protocolo de descongelamento rápida ($75^{\circ}\text{C}/7''$). Da mesma forma, os resultados do presente estudo corroboraram com os de SANTOS (2003). De acordo com ENGLAND (1992), a concentração de glicerol utilizada para o congelamento do sêmen de cães varia de 4 a 11%, sendo que, segundo WATSON (1981), a concentração ótima do agente crioprotetor glicerol em um meio diluente, representa um equilíbrio entre o efeito protetor e o efeito tóxico do mesmo.

KEITH (1998), ao avaliar isoladamente o glicerol e diferentes amidas, entre elas a dimetil-formamida, observou que o glicerol apresentou a motilidade progressiva pós-descongelamento superior a dimetil-formamida na espécie equina.

Já, SILVA (2004), relata que após o descongelamento a dimetil-formamida pode ser uma alternativa, como crioprotetor isolada ou associada ao Glicerol, mantendo a qualidade espermática caprina, após a criopreservação.

Outro fator importante na superioridade do tratamento T3, deve-se possivelmente ao protocolo de descongelamento rápido, devido à redução da formação de cristais de gelo intracelular, o que permite a diminuição do estresse a célula espermática associada à preservação da integridade conformacional da mesma (SÖDERQUIST *et al.*, 1997). De acordo com PENA (2000), o descongelamento lento expõe a célula espermática a maiores oscilações de temperatura, desencadeando assim, uma maior movimentação lipídica e protéica, o que influencia diretamente na

reorganização da estrutura física da célula, diminuindo dessa maneira a viabilidade espermática.

Resultados semelhantes foram encontrados por ROTA *et al.* (1998), na espécie canina e BARRETO *et al.* (2002), na espécie bovina onde observaram que o descongelamento rápido também aumentou a recuperação e longevidade dos espermatozoides, quando comparados à taxa lenta de descongelamento.

Vários autores obtiveram bons resultados em seus protocolos com o descongelamento rápido (50 a 70°C por 8 a 15 segundos) como FERGUSON *et al.* (1989), SILVA & VERSTEGEN (1995) IVANOVA-KICHEVA *et al.* (1995), porém, também existem vários autores que encontraram bons resultados com o protocolo de descongelamento lento (37°C por 1 minuto) como YUBI (1984), DOBRINSKI *et al.* (1993) e ENGLAND (1993). Dessa forma, estudos comparativos sobre as temperaturas de descongelamento revelam resultados conflitantes, indicando a necessidade de haver mais pesquisas nessa área, a fim de se estabelecer uma temperatura ideal e eficiente na preservação da viabilidade espermática de cada espécie envolvida (ROTA *et al.* 1998).

Foi observada uma correlação positiva ($r^* = 0,74$) ($P < 0,01$) entre motilidade progressiva no tempo zero com o resultado apresentado no TTR. Segundo MOLINIA *et al.* (1994), amostras com elevados valores de motilidade progressiva avaliada logo após o descongelamento, demonstram tendência em manter este padrão por mais tempo, apresentando dessa forma, valores mais homogêneos, devido à queda gradativa da mesma ao longo do período de incubação. Isto poderia explicar a superioridade dos tratamentos T1 e T4; e T3 e T6 demonstrado pelos resultados da motilidade progressiva logo após o descongelamento até aos 90 minutos do TTR.

Entretanto, resultados superiores ao final do TTR lento foram apresentados por SILVA & VERSTEGEN (1995); PEÑA *et al.* (1998a); WILSON (1993); STROM *et al.* (1997); IVANOVA-KICHEVA *et al.* (1997); RODRIGUES, (1997), PENA *et al.* (1998); ROTA. (1998); ROTA *et al.* (1999), os quais relataram motilidade espermática de cerca de 15 a 20%, após duas horas de incubação. Contudo, essa diferença deve ter ocorrido devido aos autores citados terem utilizado protocolos distintos de resfriamento, como diferentes concentrações de Glicerol no diluente (OLAR *et al.*, 1989), diferentes métodos de envasamento do sêmen (THOMAS *et al.*, 1993) e diferentes taxas de congelamento (DOBRINSKI *et al.*, 1993).

O teste hiposposmótico tem por princípio avaliar uma das propriedades das membranas biológicas, que é o transporte seletivo de moléculas e esse só ocorre, de maneira eficiente, nas células com a membrana plasmática íntegra (JEYENDRAN *et al.*, 1984, JEYENDRAN *et al.*, 1992). Essa técnica é caracterizada pelo influxo de água, observado mais facilmente na região da cauda que na região da cabeça, sendo a reação caracterizada pelo enrolamento da cauda (JEYENDRAN *et al.*, 1984; KUMI-DIAKA, 1993). Portanto naquelas que já sofreram alguma alteração na membrana pode se esperar que a resposta ao Teste Hiposmótico não seja tão evidente.

No teste hiposposmótico, mediante a avaliação de cada associação crioprotetora (T1 e T4, T2 e T5, e T3 e T6), diferida somente pelo protocolo de descongelamento utilizado ($P < 0,01$) (Tabela 6), foi possível observar semelhança dos resultados, demonstrando não haver influência dos protocolos de descongelamento rápido ou lento, sobre o percentual de cauda espermática enrolada.

Os resultados do teste hiposposmótico ($P < 0,01$) (Tabela 6) demonstraram que todas as associações crioprotetoras testadas apresentaram adequado percentual de espermatozóides com cauda enrolada, estando condizentes aos valores encontrado na literatura, o qual seria entre 40 a 60%, considerando a espécie humana, equina, caprina e, também canina (MC LAUGHLIN *et al.*, 1992; KUMI-DIAKA, 1993; YAVETZ *et al.*, 1995; ENGLAND & PONZIO, 1996; ESTEVES *et al.*, 1996; SODERQUIST *et al.*, 1997; NEILD *et al.*, 1999).

Já, na avaliação comparativa entre as associações crioprotetoras testadas, foi demonstrada superioridade dos tratamentos T1, T3 e T6, quanto ao percentual de espermatozóides com cauda enrolada comparado com os resultados das demais associações (Tabela 6). No entanto, foi observado um elevado percentual de dobramento de cauda espermática no tratamento T3 comparado aos demais tratamentos. Provavelmente, o fator responsável por este resultado observado no teste hiposposmótico demonstrado pelo tratamento T3, deve-se interação da temperatura rápida de descongelamento associada aos constituintes do meio diluente base, como os fosfolipídios da gema de ovo (WATSON, 1981) e ao tipo e concentração do crioprotetor utilizado, resultando na proteção e estabilidade da membrana espermática criopreservada.

Tabela 6. Valores percentuais médios do teste hipo-osmótico (Teste hiposmótico) em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas à criopreservação com diferentes associações crioprotetoras.

Sêmen Descongelado		
Tratamento	Dobramento Hiposmótico (%)	CV
T1	60,0 ^{a,b}	26,6
T2	52,6 ^b	13,4
T3	68,4 ^a	14,8
T4	57,4 ^b	18,1
T5	54,7 ^b	12,7
T6	60,2 ^{a,b}	15,6

T1) = dimetil-formamida + glicerol; T2) = Dimetil-formamida + Trealose; T3) = Glicerol; T4) = Dimetilformamida + Glicerol; T5) = Dimetil-formamida + Trealose; T6) = Glicerol; /T1, T2 e T3 descongelados à 75 C°/7sg/ seguido de imersão em Banho-Maria à 37 C°; T4, T5 e T6 descongelados à 37 C°/60sg / CV = Coeficiente de variação, Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,01), pelo teste de Duncan.

No presente estudo, a associação crioprotetora Dimetil-formamida e Trealose, (T2 e T5) foi à única a qual não apresentou bons resultados quanto a motilidade progressiva no pós-descongelamento, mas apresentou resultados aceitáveis no teste hiposmótico, segundo os padrões preconizados por OETTLÉ (1993). WATSON (1995), descreve que é possível ocorrer diminuição de energia disponível do diluente utilizado, o que resultaria em baixa motilidade, sem contudo, verificar alto índice de lesão da membrana plasmática. Segundo CROWE *et al.*, (1987) a Trealose tem como principal função dar estabilidade à membrana plasmática durante os processos de congelamento e descongelamento, evitando assim os eventos da fase de transição na bicamada lipídica da membrana plasmática.

Contudo, foi verificada uma correlação positiva ($r^* = 0,47$) (P<0,01) entre a motilidade progressiva e Teste Hiposmótico no presente estudo. Este resultado corrobora com JEYENDRAN *et al.*, (1984); KUMI-DIAKA, (1993); RODRIGUEZ-GIL *et al.*, (1994); e NEILD *et al.*, (1999) devido à correlação positiva observada entre os respectivos parâmetros.

A integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal, foram avaliadas utilizando sondas fluorescentes. Esta técnica necessita de uma reação intracitoplasmática para que o corante emita fluorescência verde, indicativa de

integridade de membrana plasmática e acrossomal (HARRISON & VICKERS, 1990; ROTA *et al.*, 1997; CUNHA, 1997; PENA *et al.*, 1998; ROTA *et al.*, 1999).

Sendo assim, os tratamentos T3 e T6, os quais apresentaram o Glicerol como agente crioprotetor demonstraram superioridade quanto à porcentagem de células íntegras. Esses dados estão apresentados na Tabela7 (P<0,01).

Tabela 7. Valores percentuais médios da integridade de membrana plasmática de amostras seminais de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas á criopreservação com diferentes associações crioprotetoras.

Sêmen Descongelado		
Tratamento	Integridade de membrana plasmática	CV
T1	52,5 ^b	23,3
T2	48,2 ^b	14,0
T3	64,2 ^a	14,9
T4	53,9 ^b	19,4
T5	53,5 ^b	11,4
T6	56,8 ^{a,b}	13,2

T1) = dimetil-formamida + glicerol; T2) = dimetil-formamida + trealose; T3) = glicerol; T4) = dimetilformamida + glicerol; T5) = dimetil-formamida + trealose; T6) = glicerol; /T1, T2 e T3 descongelados a 75C°/ 7", seguido de imersão em água a 37C°;/ T4, T5 e T6 descongelados a 37C°/ 60"/ CV=Coeficiente de variação, Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna e por etapas, diferem entre si (P<0,01), pelo teste de Duncan, Coloração com diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP) e visualização em microscopia de fluorescência direta.

O percentual de células íntegras encontradas no presente experimento demonstrou superioridade em comparação ao resultado encontrado por HAY *et al.* (1997),o qual utilizou cinco taxas diferentes de congelamento, desde taxas lentas até muito rápidas, que podem ter causado maiores danos celulares, aumentando o percentual de células lesadas dessa forma, os autores afirmaram que a curva ótima para o congelamento do sêmen canino é de 30°C/minuto.

As associações de dimetil-formamida e glicerol; e dimetil-formamida e trealose representadas pelos respectivos tratamentos T1 e T4; e T2 e T5 demonstraram inferioridade quanto ao percentual de célula espermática íntegra frente aos resultados apresentados pelos tratamentos T3 e T6. Apesar da dimetil-formamida possuir peso molecular inferior ao Glicerol e baixa toxicidade a célula espermática

(SYKES, 1989), não foi demonstrada eficiência deste agente crioprotetor quanto à integridade celular espermática, quando associado ao Glicerol ou a Trealose. SANTOS (2003), utilizando a mesma técnica de fluorescência observou resultados semelhantes em cães, onde o maior percentual de alterações acrossomais, como edema de acrossoma, foi apresentado com o uso do crioprotetor dimetil-formamida 5% em meio Lactose gema. GONZALES (2004), também verificou a presença de membrana plasmática e acrossoma lesados mediante a utilização da dimetil-formamida em meio diluente Tris na espécie bovina. Provavelmente, o crioprotetor dimetil-formamida quando associado a outro agente crioprotetor como o Glicerol e a Trealose, possibilite a realização de reações que potencializem o efeito um do outro, aumentando dessa maneira, o grau de toxicidade à célula espermática, fato esse responsável pelas lesões evidenciadas quanto à integridade funcional da membrana celular.

Foi observada correlação positiva no que diz respeito alterações acrossomais avaliadas na microscopia de contraste de fase e percentagem de espermatozoides lesados visualizados na fluorescência ($r=0,86$) ($P<0,01$). Dessa maneira, os resultados apresentados pelo teste de fluorescência e de Teste Hiposmótico, demonstraram alto índice de fidedignidade.

NEILD *et al.* (1999), também observaram correlação positiva ($r=0,67$) ($P<0,01$) entre o teste de teste hiposmótico e o teste de coloração por sonda fluorescente, sendo estatisticamente iguais às médias encontradas para os dois testes.

5. CONCLUSÕES

A célula espermática criopreservada pela associação glicerol descongelada por meio do processo rápido de descongelamento, apresentou os melhores resultados comprovados pelo teste de viabilidade espermática *in vitro*, caracterizando maior eficácia na preservação dos espermatozoides da espécie canina comparado às demais associações testadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLER, J. F., ALBERIO, R. H., IOVANNITTI, B., et al. Criopreservación de embriões mamíferos Ia. Parte: Características generales de la congelación. **Revista de Medicina Veterinária**, v.76, n.2, p.132-136, 1995.
- AMANN, R. P. Can the Fertility Potential of a Seminal Sample be predict accurately **Journal of Andrology**, v.10, n.2, p.89-98, 1989.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. In vitro Evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v.14, n.6, p.397-406, 1993.
- ANDERSEN, K. Fertility of Frozen Dog Semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.13, p.128-130, 1972.
- BALL, B. A., MEDINA, V., GRAVANCE, C. G., BAUMBER, J. Effects of antioxidants on reservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 50C. **Theriogenology**, v.56, p.577-89, 2001
- BARNABÉ, R. C., BARNABÉ, V. H., VIANA, W. T. et al. **Correlações entre motilidade progressiva e retenção de acrossoma em sêmen de bovinos, pós-descongelamento e após provas de termo-resistência**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.18, p.61-68, 1981.
- BARRETO, M. A. P., SOUZA, G. V., FAGUNDES, B., FONSECA, C. W., MALTA, M. F. R., MATTA, C. G. F., ANARADE, M. P., TILBURG, M. F., LIMA, J. A. P., MEIRELES, L. A. M., SILVA, J. F. S. Influência de um termo-sistema de descongelamento ultra-rápido na motilidade e integridade de membranas de espermatozoides de três touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.145-147, 2002.

- BARTLETT, D. J. Studies on dog semen- II. Biochemical characteristics. **Journal Reproduction and Fertility**, v.3, p.190-205, 1962.
- BILODEAU, J. F., BLANCHETTE, S., GANGNON, C., SIRARD, M. A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.56, p.275-86, 2001.
- BLANCO, J. M., GEE, G., WILDT, D. E., DONOGHUE, A. M. Species variation in osmotic cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1167-1171, 2000.
- BORDIGNON, V., OESCHOMPS, J. C., SECMN, A., PALUDO, G. R., VIVAN, J. C., NICOLA, E., BOZZATO, J. S, GONZALES, J. A., PIMENTEL, C. A. Efeito da trealose sobre a motilidade, acrossoma e fertilidade do sêmen congelado de suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.20, n.2, p.54-62, 1996.
- BUENO, R. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento**. Viçosa, MG: UFV. 2000. 91f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- CARDOSO, R. C. S., SILVA, A. R., UCHOA, D. C. et al. Efeito dos estágios do processo de congelamento sobre a qualidade do sêmen canino diluído em solução a base de água de coco. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.1, p.26-30, 2000.
- CARDOSO, R. C. S., SILVA, A. R., UCHOA, D. C., SILVA, L. D. M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v.59, p.743-751, 2003.
- CAVALCANTI, M. C. O., MOURA, C.S., GUERRA, M. M. P., SILVA, S. V. Ação crioprotetora do glicerol e etilenoglicol no congelamento do sêmen de cão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.174-176, 2002.
- CHACUR, M. G. **Avaliação da congelamento de sêmen bubalino *Bubalus bubalis*, com os diluidores glicina gema, triladyl e Tes em diferentes tempos de equilíbrio**. Botucatu, 1996. 117p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 1996.
- CHECK, M. L., CHECK, J. H., LONG, R. Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane. **Archives of Andrology**, v.27, p.155-160, 1991.

- CHRISTIANSEN, J. Reprodução no cão e no gato. São Paulo: Manole, p 361 1988.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal** (2ed), Belo Horizonte, CBRA, 49p., 1998.
- CONCANNON, P. W., BATTISTA, M. In: **Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice**. Philadelphia: WB Saunders. p.1247-1259, 1989.
- COTORELLO, A. C. P., HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen eqüino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.1, p.14-25, 2002.
- CROSS, N. L., MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. **Biology Reproduction**, v.41, p.635-641,1989.
- CROWE, J. H., CROWE, L. M., CARPENTER, J. F. et al. Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugars. **Journal Biochemical**, v.242, p.1-10, 1987.
- CUNHA, I. C. N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicinagema** Botucatu, 1997. 124p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 1997.
- CUNHA, I. C. N. Atualidades sobre inseminação artificial na espécie canina. In JORNADA DE INTEGRAÇÃO DOS ALUNOS DE GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO, 2, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu, p.152-79, 1998.
- CUNHA, I. C. N., LOPES, M. D. Efeitos da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.306-307, 1999.
- CUNHA, I. C. N., LOPES, M. D. Efeito do período de equilíbrio e meios diluidores sobre o sêmen canino congelado e descongelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.470-471, 2001.
- DALIMATA, A. M., GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with threalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v.48, n.5, p.831-841, 1997.
- DAVIES, P. R. A. **Study of spermatogenesis, rates of sperm production, and methods of preserving the semen of dogs**. Dissertação (Doctor of Philosophy), Sydney, p 272, 1982..

- DE LEEUW, F. E., DE LEEUW, A. M., DEN DAAS, J. H. G. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Criobiology**, v.30, p.32-44, 1993.
- DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondante du sperme congelé. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v.4, p.215-224, 1967.
- DOBRINSKI, I., LULAI, C., BARTH, A. D., et al. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. **Journal of Reproduction Fertility Supplement**, v.47, p. 291-296, 1993.
- DOEBBLER, G. F. Crioprotective Compounds – **Review and Discussion of Structure and Function**. **Cryobiology**, v.3, n.1, p.2-11, 1966.
- ENGLAND, G. C. W., ALLEN, W. E. Seminal characteristics and fertility in dogs. **Veterinary Record**, v. 125, p. 399, 1989.
- ENGLAND, G. C. W., ALLEN, W. E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v.37, n.2, p. 373-381, 1992.
- ENGLAND, G. C. W. **The criopreservation of dog semen**. London, 1992. Thesis submitted for Fellowship of Royal College of Veterinary Surgeons, 1992.
- ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction Fertility Supplement**, v.47, p. 243-255, 1993.
- ENGLAND, G. C. W., PONZIO, P. Comparisons of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v. 46, p. 165-171, 1996.
- ESTEVEZ, S. C., SHARMA, R. K., THOMAS, A. J., et al. Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm. **Fertility and Sterility**, v.66, n.5, p.798-804, 1996.
- FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p. 1-13, 1986.
- FARSTAD, W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. **Journal Small Animal Practice**, v. 25, p. 561-565, 1984.
- FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.

- FELDMAN, E. C., NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2.ed., Philadelphia, Saunders co., 785 p, 1996.
- FERGUSON, J. M., RENTON, J. P., FARSTAD, W., et al. Insemination of beagle bitches with frozen semen. **Journal of Reproduction Fertility Supplement**, v. 39, p. 293-298, 1989.
- FOOTE, R. H. The effects of electrolytes, sugars, glycerol and catalase on survival of dog semen stored in buffered-yolk mediums. **American Journal of Veterinary Research**, v.104, p.32-36, 1964.
- FOOTE, R. H., LEONARD, E. P. The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. **Cornell Veterinary**, v.54, p.78-89, 1964.
- FONTBONNE, A., BADINAND, F. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. **Journal of Reproduction Fertility Supplement**, v. 47, p.531-532, 1993.
- GILL, H.P.; KAUFMAN, C.F.; FOOTE, R.H.; KIRK, R.W. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, USA. v.31, n.10, p. 1807-1813, Oct. 1970.
- GRAHAM, J. K.; Evaluation of alternative cryoprotectans for preserving stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATIO, 14., 2000. **Proceedings...** Stockholm, p.307, 2000.
- GOMES, G.M., JACOB, J.F.C., MEDEIROS, A.S.L. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Machador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.
- GONZALES, R. A. F.; **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozóiide bovino**. Pirassinunga, SP: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária, 2004. 92f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, 2004.
- GOVETTE, G., LINDE-FORSBERG, C., STROM, B. A successful concept for freezing of dog semen. *Proceedings of the 13th Int. Congress Animal Reproduction (ICAR)*, v.2, p.5-8, 1996.

- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6ed. São Paulo: Manole, . p 582, 1995.
- HANADA, A., NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.60, p.247-252, 1980.
- HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal Royal Microscopical Society**, v.76, p.84-97, 1957.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, C. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.
- HAY, M. A., KING, W. A., GARTLEY, C. J., et al. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v.48, p.1329-1342, 1997.
- HEIDRICH, S. **Ein beitrage zur tiefgefrierung von rudensperma**. Berlin, 1977, 110p. Dissertação (Doctor Medicinae Veterinarie) - Klinik für Klautierkrankheiten und Fortpflanzungskunde der Freien Universitat; 1997.
- HELD, J. P. Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today,s veterinary practice. In: CANINE MALE REPRODUCTION SYMPOSIUM, 1997, Montreal. **Anais...** Montreal, 1997.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**. v.53, p.47-58, 2000a.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000b.
- HOSSAIN, A. M., RIZK, B., BARIK, S., et al. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. **Human Reproduction**, v.13, n.6, p.1578-1583, 1998.
- IVANOVA-KICHEVA, M. G., SUBEV, M. S., BOBADOV, N. D., et al. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 44, p.563-569, 1995.
- IVANOVA-KICHEVA, M.G., BOBADOV, N., SOMLEV, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, v.48, p.1343-1349, 1997.
- JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Vet.**, v.10, n.2, p.156-165, 1994.

- JEYENDRAN, R. S., VAN DER VEN, H. H., PEREZ-PELAEZ, M., et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.
- JEYENDRAN, R. S., VAN DER VEN, H. H., ZANEVELD, L. J. D. The hypoosmotic swelling test: an update. **Archives of Andrology**, v.29, p.105-116, 1992.
- JOHNSTON, S. D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet. Clin. of North Am.:* **Small Animal Practice**, v.21, n.3, p.545-551, 1991.
- JOHNSTON, S. D., KUSTRITZ, M. V. R., OLSON, P. N. S. **Canine and feline Theriogenology**, 1ed. Philadelphia: Saunders, 2001. 592p.
- LARSSON, B., RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization testes to predict semen fertility. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.327-336, 2000.
- LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extend semen. *Vet. Clin. of North America:* **Small Animal Practice**, v.21, n.3, p.467-485, 1991.
- LINDE-FORSBERG, C. Artificial insemination with fresh, chilled extend, and frozen-thawed semen in the dog. *Semin. in vet. medic. and surg.* **Small Animal Practice**, v.10, n.1, p.48-58, 1995.
- 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. **Journal of Reproduction Fertility Supplement**, v.39, p.299-310, 1989.
- LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. **Journal of Reproduction Fertility Supplement**, v.47, p.313-323, 1993.
- LINDE-FORSBERG, C., STRÖM HOLST, B., GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozenthawed dog semen: a retrospective study. **Theriogenology**, v.52, p.11-23, 1999.
- LOPES, M. D., PAPA, F. O. Effects of diferent diluents and method of centrifugation for canine semen congelation. In: CONGRESS OF THE WORDL SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 23, 1998, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires, 1998. p.799.

- KEITH, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa.** 1998. 116f. Dissertação (Master of Science)- Escola de Veterinária, Universidade Estadual do Colorado, U.S.A.
- KIRK, E. S. **Flow cytometric evaluation of stallion sperm.** Fort Collins- CO, 2001. 131p. Thesis (Master of Science) – Colorado State University, 2001.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, p.1279-1289, 1993.
- MARSHBURN, P. B., McINTIRE, D., CARR, B. R., BYRD, W. Spermatozoa characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. **Fertility and Sterility**. v.58, p.179-86, 1992.
- MEDEIROS, A. S. L., GOMES, G. M., CARMO, M. T., PAPA, F. O., ALVARENGA, M. A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.1-4, 2002.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial nos cães.** 6.ed. Porto Alegre: Sulina, p.750, 1987.
- MC LAUGHLIN, E. A., FORD, W. C. L., HULL, G. R. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**, v.95, p.527-534, 1992.
- MOLINIA, F. C., EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reproduction Nutrition Development**, v.34, p. 491-5000, 1994.
- MORTON, D. B., BRUCE, S. G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **Journal of Reproduction Fertility**, Supplement, v.39, p.311-316, 1989.
- NEILD, D., CHAVES, G., FLORES, M., et al. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.
- NOTHLING, J. O., GERSTENBERG, C., VOLKMANN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – A retrospective study. **African Veterinary Ass.**, v.66, p.49-55, 1995.
- OETTLÉ, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction Fertility**, v.47, p.257-260, 1993.

- OLAR, T. T., AMMAN, R. P., PICKET, B. W. Relations among testicular size. Daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. **Biology of Reproduction**, v.29, p.1114-1120, 1983.
- OLAR, T. T. **Cryopreservation of dog semen**. PhD Thesis, Colorado State University, 1984.
- OLAR, T. T., BOWEN, R. A., PICKETT, B. W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v.31, n.2, p.451-461, 1989.
- PAPA, O. F. **Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de eqüinos**: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial. Botucatu, 1987. 150p. Tese (Livre Docência em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 1987
- PAPA, F. O. TAVARES, C. V. N., MEIRA, C., BICUDO, S. D., ALVARENGA, M. A. Glicina-Gema: Proposta de um novo diluidor para congelação de sêmen eqüino. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5, 1993, Portugal. **Anais...** Portugal, 1993. v.2, p.378-84.
- PAPA, R. T. C., SANTOS, F. O., MACEDO, L. P., ALVARENGA, M. A., MELO, C. M., DELL'AQUA Jr., J. A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelação de sêmen eqüino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003.
- PAQUIGNON, M. **Freezing and thawing extenders for boar spermatozoa**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1, 1985, Uppsala. *Proceedings...* Uppsala: 1985. p.129-145.
- PEÑA, A.I. **Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación**. Lugo. 1997. Doctoral thesis, Universidade de Santiago de Compostela, 1997.
- PEÑA, A. I. **Flow cytometry in the assessment of fresh and frozenthawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity**. Doctoral thesis, Uppsala, 2000.
- PEÑA, A. I., BARRIO, F., QUINTELA, L. A., et al. Effect of glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p. 163-174, 1998.

- PENÃ, 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.544, p.859-875, 2000.
- PEÑA, A., BARRIO, F., QUINTELA, L. A., HERRADÓN, P. G. Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p. 5-9, 1998a.
- PEÑA, A., BARRIO, F., QUINTELA, L. A., HERRADÓN, P. G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-174, 1998b.
- PEÑA, A., BARRIO, F., QUINTELA, L. A., HERRADÓN, P. G., Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-174, 1998b.
- PÉREZ Y PÉREZ, F. **Riproduzione Animale**: inseminazione artificiale e trapianto embrionale. Padova: Piccin Nuova Libreria , 1984.
- RIGAU, T., FARRÉ, M., BALLESTER, J., MOGAS, T., PEÑA, A., RODRIGUEZ-GILL, J. E. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. **Theriogenology**, v.56, p.801-15, 2001.
- RIGAU, T. RIVERA, M. PALOMO, M. J. et al. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. **Reproduction**, v.123, p.579-591, 2002.
- ROHLOFF, D.; LAIBLIN, C. H.; HEIDRICH, S. Untersuchungen über die Gefrierschutzwirkung von Glycerin und DMSO bei der Tiefgefrierung von Rüdensperma. **Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.**, Berlin: v. 91, p. 31-33, 1978.
- RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor a base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canio criopreservado**. 1997. 177f. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1997.
- RODRIGUEZ-GIL, J. E., MONTSERRAT, A., RIGAU, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrossome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.42, p.815-829, 1994.
- ROTA, A. **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa**. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Obstetrics and Gynaecology, 1998. 43p. Doctoral Thesis - Acta Universitatis Agricultural Sueciae Veterinaria, 37, 1998.

- ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C., VANOZZI, J., et al. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. In: ROTA, A., STRÖM, B., LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. **Theriogenology**, v.44, p.885-900, 1995.
- ROTA, A., STROM, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUES-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1997.
- ROTA, A. **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences**, 1998. p. 1-15. (Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Veterinaria, 37). 1998
- ROTA, A., IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J., LINDE-FORSBERG, C. 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.
- ROWSON, L. E. A. Infertility of cow, sow and bitch. **Irish Veterinary Journal**, v.8, p.216-21, 1954.
- SAEG- **Sistema de Análises Estatística e Genética**. Universidade Federal de Viçosa - UFV, Central de processamento de dados, Viçosa- M.G., 1999.
- SALISBURY, G. W., VANDEMARK, N. L. **Physiology of Reproduction and Artificial Insemination**. San Francisco: W H Freeman, 1978.
- SANTOS, S. E. C., VANNUCCHI, C. I., SATZINGER, S. A., ASSUMPÇÃO, M. E. O. D'A., VISINTIN J. A Comparison of five extenders for canine semen freezing. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, 1999.
- SANTOS, S. E. C., VANNUCCHI, C. I., SATZINGER, S. et al. Comparação de dois crioprotetores na congelação de sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p. 472-473, 2001.
- SANTOS, O. E. C. **Viabilidade "in vitro" do sêmen de cão submetido a congelação com diferentes diluidores e crioprotetores**. Belo Horizonte, MG: UFMG. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.
- SEAGER, S. J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. **A. I. Digest.**, v.17, p. 6-16, 1969.

- SEAGER, S. J. ***Semen collection and evaluation in the dog***. In: MORROW, A. (ed). Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals. Philadelphia, Saunders co. 1986, p.539-541.
- SEAGER, S. J., FLETCHER, W. S. Progress on the use of frozen semen in the dog. **The Veterinary Record**, v. 92, p.6-10, 1973.
- SEAGER, S. J., PLATZ, C. C., FLETCHER, W. S. Conception rates and related data using frozen dog semen. **Journal of Reproduction Fertility**, v.45, p.189-192, 1975.
- SILVA, L. D. M., VERSTEGEN, J. P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.571-579, 1995.
- SILVA, A. R. **Otimização de uma metodologia para congelação do sêmen canino diluído em tampão Tris**. 2001. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2001.
- SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C.S.; SILVA, L.D. M. efeito do processo de descongelamento sobre a viabilidade do sêmen canino in vitro. **Ciência Animal**, v.8, p.75-80, 1998.
- SILVA, A. R., CARDOSO, R. C. S., SILVA, L. D. M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluentes à base de Tris e água de coco. **Ciência Rural**, v.30, n.6, p.1021-1025, 2000.
- SILVA, A. F. **Uso da dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino**. Viçosa – MG. UFV. 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- SNOECK, P. P. N., HENRY, M., SANTOS, L. M. G. Avaliação de crioprotetores no congelamento de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p. 454-455, 2001.
- SNOECK, P. P. N., HENRY, M., JULIANI, G. C. Efeito de três temperaturas de descongelamento sobre os espermatozoides eqüinos congelados com diferentes agentes crioprotetores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.181-184, 2002.
- SNOECK, P. P. N. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade**. Belo Horizonte, MG:

- UFMG. 2003, 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).-Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.
- SODESQUIST, L., MADRID-BURY, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assesment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, v.48, p.1115-1125, 1997.
- STROM, B., ROTA, A., LINDE-FROSBERG, C. “*In vitro*” characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p.247-256, 1997.
- STRÖM HOLST, B., LARSSON, B., LINDE-FORSBERG, C. et al. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. **Journal of Reproduction Fertility**, v.119, p.201-206, 2000.
- STRÖM HOLST, B. **In vitro characterisation of cryopreserved canine spermatozoa with special reference to post-thaw time and zona pellucida binding capacity**. Uppsala, 1999. Doctor’s dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences.
- SYKES, P. **Guia de mecanismos da química orgânica**. Lisboa: Universidade Nova Lisboa/Faculdade de Ciências e Tecnologia, 1989,60p.
- THOMAS, P. G. A., LARSEN R. E., BURNS, J. M., et al. A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v. 40, p. 1199-1205, 1993.
- THOMAS, P. G. A., SURMAN, V. MYERS-WALLEN, V. N., et al. Addition of sodium dodecyl sulphate to Tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. *Proc. of 12th International Congress Animal Reproduction AI*, v. 4, p. 1823-1825, 1992.
- VIDAMENT, M., DAIRE, C., YVON, J. M. et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, v.58, p.249-251, 2002.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E., NEILL, J. **The Physiology of Reproduction**. New York: Ed. Raven Press, 1994, p.135-185
- YAVETZ, H., HAUSER, R., YOGEV, L., et al. Advanced methods for evaluation of sperm quality. **Andrology**, v.27, p. 31-35, 1995.
- YILDIZ, C., KAYA, A., AKSOY, M. et al. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v.54, p.579-585, 2000.

- WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction Fertility**, v.62, p.483-492, 1981.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.871-891, 1995.
- WILSON, M. S. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **Journal of Reproduction Fertility**, v.47, p.307-311, 1993.
- ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu, 1998. 121p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 1998.
- ZAVOS, P. M. Hypoosmotic swelling test (HOS)/Functional integrity of sperm membrane. **Assisted Reproductive Technology. and Andrology**, v.2, p.215-216, 1991.

7. ANEXO

Anexo 1. Solução de estoque e de trabalho empregadas na coloração de fluorescência para avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides caninos submetidos a criopreservação.

Soluções	Constituintes	Quantidades
I- Solução estoque de CFDA	CFDA DMSO	9,2 mg 20mL
II- Solução estoque de IP	IP NaCl 0,9%	10mg 20mg
III- - Solução estoque de Formaldeído	Formalina a 40% Solução fisiológica	Diluição 1:80
IV- Solução estoque de citrato de sódio a 3%	Citrato de sódio Solução fisiológica	3g 100mL
V- Solução de Trabalho	CFDA IP Formaldeído Solução IV	20µl 10µl 10µl 960µl
Amostras para avaliação	Sêmen Solução de trabalho	10µl 40µl

Fonte: ZUCCARI, (1998).