

REGINA BUENO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO, UTILIZANDO DOIS
DILUIDORES E DOIS PROTOCOLOS DE RESFRIAMENTO.**

Tese 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
2000**

Aos meus pais, Olavo e Gilka,
por me ensinarem a trilhar o caminho da vida
e por terem tornado possível a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela sua acolhida e por ter fornecido condições de realização do curso.

Ao Departamento de Veterinária, por ter sido a minha segunda casa por oito anos e por ter possibilitado o meu aprendizado.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo durante o período do Mestrado.

Ao meu orientador, Eduardo Paulino da Costa, por seus ensinamentos e amizade.

Aos meus conselheiros, José Domingos Guimarães e Tarcísio Antônio Rego de Paula. O primeiro por ter clareado minhas dúvidas, durante toda a realização do experimento e o segundo por ter me introduzido no mundo científico.

Aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária da UFV, pelo auxílio, amizade e anos de convívio, que sempre serão lembrados.

Ao Seu Nenzinho, funcionário do Laboratório de Reprodução, pela sua dedicação e palavras de sabedoria.

Ao Fernando, Sávio e Daniela e a todos os estagiários do Laboratório de Reprodução, que tanto auxiliaram e participaram de cada etapa cumprida.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, Juarez Lopes Donzele e Rita Flávia M. Oliveira, por terem colaborado para a realização da tese.

Aos proprietários dos cães utilizados no experimento, Débora, Luciene e Leonardo, por terem colaborado nos cedendo seus animais.

Aos colegas de mestrado, Moema, Fabienne, Carlos, Almir e Marcelo pela convivência e apoio.

Ao meu amor, Vanderlei, que esteve ao meu lado em todos os momentos e compartilhou das alegrias e tristezas.

Aos meus irmãos e cunhados, Gui, Lú, Anne, Courinha e Eliana, pelo amor e amizade fraterna que são muito importantes para mim.

Aos meus sobrinhos, Luísa e Pedrão, por me presentear com seu amor mais puro, por meio de um simples sorriso.

Aos meus grandes amigos, Gláucio, Roueda, Séfora, Andréa, Janaína, Ana Paola, Talita, Luana, que me auxiliaram com seu carinho e palavras de estímulo.

Aos meus filhotes, Cafú, Tequinha, Neg, Flora e Timbó, pelo seu amor incondicional e sua presença em minha vida.

Aos animais, em especial aos cães desse experimento, Auasca, Boris e Indy, que com seus latidos, brincadeiras e amizade, tornaram nosso trabalho ainda mais estimulante e alegre.

BIOGRAFIA

REGINA BUENO, filha de Olavo Bueno e Gilka Flória Corte Bueno, nasceu em 24 de janeiro de 1972, em São Paulo, São Paulo.

Em fevereiro de 1997, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em fevereiro de 1998, especializou-se em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 1998, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução animal, junto ao Departamento de Veterinária, nessa mesma Instituição.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Etapas do processamento do sêmen para criopreservação	4
2.1.1. Avaliação do sêmen	4
2.1.2. Diluição do sêmen	6
2.1.3. Componentes do meio diluidor	6
2.1.4. Meios diluidores para congelação de sêmen em caninos	9
2.1.5. Centrifugação do sêmen	9
2.1.6. Períodos de resfriamento e equilíbrio do sêmen	10
2.1.7. Criopreservação do sêmen	11
2.2. Métodos de análise do sêmen criopreservado	16

2.2.1. Análises <i>in vivo</i> da qualidade espermática do sêmen criopreservado	17
2.2.2. Análises <i>in vitro</i> da qualidade espermática do sêmen criopreservado	18
CAPÍTULO 1	26
QUALIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN CANINO CRIOPRESERVADO. I - UTILIZAÇÃO DE DOIS MEIOS DILUIDORES	26
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4. RESUMO E CONCLUSÕES	56
CAPÍTULO 2	58
QUALIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN CANINO CRIOPRESERVADO. II - UTILIZAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS DE RESFRIAMENTO	58
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4. RESUMO E CONCLUSÕES	79
3. RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 -	Composição dos meios diluidores Tris-citrato e Tes-Tris, utilizados para a diluição do sêmen, nos diferentes tratamentos	31
Tabela 2 -	Características seminais de cães da raça Labrador do Retriever, doadores de sêmen, para experimentação em criopreservação espermática	36
Tabela 3 -	Valores médios (X) e coeficiente de variação (CV) da motilidade (%) espermática progressiva e vigor espermático e em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes diluidores para a criopreservação	36
Tabela 4 -	Valores percentuais médios (X) e coeficiente de variação (CV) do teste hipo-osmótico (HOS-T) em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a criopreservação com diferentes diluidores	38
Tabela 5 -	Valores percentuais médios (X) e coeficiente de variação (CV) de acrossomas espermáticos íntegros em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a criopreservação com diferentes diluidores	41

Tabela 6 -	Valores médios (X) percentuais e coeficiente de variação (CV) de motilidade espermática progressiva obtidos durante o TTR, nas amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas à criopreservação com diferentes diluidores	44
Tabela 7 -	Valores médios de vigor obtidos durante o TTR, nas amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes diluidores e avaliadas durante as etapas da criopreservação	45
Tabela 8 -	Correlações de Pearson entre a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático, imediatamente após a descongelação com o TTR do sêmen congelado/descongelado	49
Tabela 9 -	Correlações de Pearson entre a motilidade espermática progressiva, o vigor espermático e o TTR com o HOS-T do sêmen resfriado e congelado/descongelado	51
Tabela 10 -	Correlações de Pearson entre a condição de acrossoma com o TTR e com o HOS-T do sêmen congelado/descongelado	53
Tabela 11 -	Correlações de Pearson entre a condição de acrossoma em diferentes etapas do processamento do sêmen.....	55
Tabela 12 -	Correlações de Pearson entre o TTR realizado no sêmen resfriado e congelado/descongelado.....	55

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Características seminais de cães da raça Labrador do Retriever, doadores de sêmen para experimentação em criopreservação espermática	69
Tabela 2 -	Valores médios e coeficiente de variação da motilidade (%) espermática progressiva e do vigor espermático em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes protocolos de resfriamento em caixa de isopor ou <i>biocool</i>	69
Tabela 3 -	Valores percentuais médios e coeficiente de variação (CV) do HOS-T* realizado nas amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever submetidas a diferentes protocolos de resfriamento em caixa de isopor e <i>biocool</i>	72

Tabela 4 -	Valores percentuais médios e coeficiente de variação (CV) da condição de acrossoma* dos espermatozóides nas amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes protocolos de resfriamento em caixa de isopor e <i>biocool</i>	73
Tabela 5 -	Valores percentuais médios (X) e coeficiente de variação (CV) de motilidade espermática progressiva durante o TTR, em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes protocolos de resfriamento em caixa de isopor e <i>biocool</i>	74
Tabela 6 -	Valores médios e coeficiente de variação de vigor espermático obtidos durante o TTR, em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a dois protocolos de resfriamento em caixa de isopor e <i>biocool</i>	75

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Curvas da motilidade espermática progressiva (%) durante o TTR de amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes diluidores para a criopreservação 46

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Desenho esquemático da caixa de isopor utilizada para resfriar as amostras do sêmen, em um dos protocolos de resfriamento .. 64
- Figura 2 - Curva de resfriamento imposta ao sêmen resfriado na caixa de isopor, com gelo e água 64
- Figura 3 - Curva de resfriamento imposta ao sêmen resfriado no congelador de células (*biocool*) 65
- Figura 4 - Curvas da motilidade espermática progressiva (%) durante o TTR de amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes protocolos de resfriamento em caixa de isopor e *biocool* 76

RESUMO

BUENO, Regina, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2000.
Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento. Orientador: Eduardo Paulino da Costa.
Conselheiros: José Domingos Guimarães e Tarcísio Antônio Rego de Paula.

Estudou-se criopreservação do sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento do sêmen, para avaliar o efeito desses sobre a qualidade espermática *in vitro*, após a congelação/descongelação. Os meios diluidores utilizados foram o Tris-citrato e o Tes-Tris e os procedimentos de resfriamento foram realizados em um congelador de células digital e em caixa de isopor. O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal - DVT-UFV, utilizando-se três machos, submetidos a uma coleta de sêmen por semana, durante cinco semanas, totalizando quinze amostras, em cada delineamento experimental. Os testes *in vitro* aplicados às amostras de sêmen foram os de: avaliação da motilidade espermática progressiva, vigor espermático, avaliação da integridade da membrana plasmática e do acrossoma, por meio dos testes hipo-osmótico (HOS-T) e câmara úmida, respectivamente e avaliação da longevidade espermática, por meio do teste de termo-resistência rápido (TTR). A análise comparativa entre os meios diluidores evidenciou que o meio diluidor

Tris-citrato foi superior ($P < 0,05$) ao meio Tes-Tris, por ter obtido nos resultados de todos os testes *in vitro*, valores em torno de 15% mais altos. Concluiu-se, portanto, que o Tris-citrato foi mais eficiente em conservar a qualidade espermática, por ter mantido viável uma maior porcentagem de espermatozóides, após a criopreservação. Houve correlação positiva entre vários testes, indicando coerência entre os resultados. A análise comparativa dos protocolos de resfriamento demonstrou que não houve diferença ($P > 0,05$) entre a caixa de isopor e o *biocool*, logo após o resfriamento. Após a descongelação, os resultados demonstraram que houve igualdade entre os protocolos quanto ao vigor espermático, ao HOS-T e a condição de acrossoma, havendo diferença ($P < 0,05$) apenas na motilidade espermática após a descongelação e durante o teste de termo-resistência, que foram superiores quando o sêmen foi resfriado na caixa de isopor. A curva de resfriamento na caixa de isopor foi de, aproximadamente, $-0,45^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ e no *biocool* de $-0,55^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, porém, na caixa de isopor a queda de temperatura não foi constante durante os 60 minutos do resfriamento, sendo que nos primeiros dez minutos a temperatura diminuiu 13°C . Parece que o perfil dessa curva favoreceu a manutenção das reservas energéticas dos espermatozóides, por terem tido seu metabolismo mais rapidamente diminuído. Os resultados dos testes para ambos os diluidores e ambos protocolos de resfriamento são compatíveis com os considerados normais para o sêmen criopreservado na espécie canina.

ABSTRACT

BUENO, Regina, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2000.
Cryopreservation of canine semen using two extenders and two cooling systems. Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Committee Members: José Domingos Guimarães and Tarcísio Antônio Rego de Paula.

A study on different extenders and cooling systems on the canine semen was taken, in order to evaluate the effects on *in vitro* characteristics of cryopreserved spermatozoa. The extenders studied were Tris-citrate and Tes-Tris and the cooling systems were accomplished in a programmable cells freezer and in a polystyrene container. The experiment took place at the Animal's Reproduction Laboratory-DVT-UFV, where three stud dogs were collected weekly for five weeks for each experiment protocol. The *in vitro* evaluations applied to the semen samples were sperm motility and forward progression, plasm membrane and acrosome integrity, through hypo-osmotic swelling test and phase contrast microscopy, respectively and semen longevity, through the thermo resistance test. A comparative analysis between the extenders has showed that Tris-citrate was superior ($P<0,05$) to Tes-Tris because the results of all the *in vitro* evaluations after cryopreservation were 15% higher for the first compared to the second extender. It was concluded, therefore, that Tris-citrate was more

efficient in preserving spermatozoa quality because it has maintained the viability of a larger percentage of them, after cryopreservation. The results of the tests are in agreement with the standard values for the freezing semen in dogs and there was also positive correlation among several semen evaluations, showing relationship among the results. The comparative analysis of the cooling systems has showed that there was no difference ($P>0,05$) between the programmable freezer and the polystyrene container, immediately after cooling and equilibration time. However, after freezing and thawing the results of forward progression, HOS-T and acrosome integrity was equal for both cooling systems but the motility and thermo resistance test was better ($P<0,05$) at polystyrene container. The cooling rate at this system was approximately $-0,45^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ and at the programmable freezer was $-0,55^{\circ}\text{C}/\text{min.}$. The temperature fall was not constant at the polystyrene container and dropped faster on the beginning of the cooling time, it seems that this cooling rate at the polystyrene container favored the maintenance of spermatozoa energy sources. The tests results for both procedures were close to the standard values for the freezing semen in dogs.

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen canino visa sua utilização em inseminação artificial (IA) e o armazenamento de material de alto valor genético por tempo indeterminado.

A seleção da espécie canina resultou em uma grande diversidade de raças, cerca de 400, que diferem entre si, tanto na aparência, quanto no aspecto comportamental. Diante disso, a criopreservação do sêmen, associada à técnica de IA, destaca-se como procedimento importante, para a preservação das características genéticas e fenotípicas dessas raças.

As razões para a utilização do sêmen congelado em caninos são inúmeras e entre as mais citadas estão a possibilidade do transporte do sêmen para longas distâncias e o seu armazenamento por tempo indeterminado. Adicionalmente, a congelação permite a diminuição de gastos, que ocorreriam com a necessidade de exportação de um animal. Evita-se ainda, o envio da fêmea para o local onde está o macho, o que é um procedimento desgastante e pode refletir negativamente na eficiência reprodutiva da fêmea, além dos riscos sanitários (LINDE-FORSBERG e FORSBURG, 1989).

A técnica de congelação permite a conservação de linhagens de alto valor, principalmente dos machos que, sabidamente, mantêm em sua progênie, características desejáveis. A congelação do sêmen permite o prolongamento

artificial da vida reprodutiva do macho, fato esse desejado por muitos proprietários e criadores. Pode-se citar ainda, a preservação de espécies de canídeos silvestres, que estão sob estudo ou em risco de extinção (MORTON, 1986).

A inseminação artificial tem sido realizada na espécie canina há muito tempo, sendo que o primeiro registro data do século XVIII, por Spalanzani em 1776, porém, a criopreservação do sêmen canino foi realizada, pela primeira vez e de forma experimental, na metade do século passado.

A primeira congelção de sêmen de cão realizada com sucesso, foi descrita por Rowson (1954) citado por ENGLAND (1993). Já os primeiros relatos de inseminação artificial, que resultaram em prenhez em cadelas, com o uso de sêmen congelado, foram realizados por SEAGER em 1969. Porém, as taxas de prenhez obtidas foram em torno de 10%. Após esse resultado, outros trabalhos foram conduzidos, para adaptação da melhor técnica para a congelção de sêmen em caninos (ANDERSEN, 1972; SEAGER e FLETCHER, 1973; SEAGER et al., 1975).

Até os dias atuais, a utilização do sêmen criopreservado, nessa espécie, não está amplamente difundida e a maior razão para isso são os resultados não satisfatórios das taxas de prenhez e tamanho de ninhada. Para a obtenção de melhores índices reprodutivos, novos estudos precisam ser conduzidos, para se relacionar a qualidade do sêmen após a descongelção com sua capacidade de fecundação. Somente assim, os índices podem ser elevados e talvez, equiparados com os resultados alcançados com a inseminação artificial, utilizando sêmen fresco, resfriado ou congelado, em outras espécies de animais domésticos.

No entanto, na última década houve maior interesse na I A e na criopreservação do sêmen na espécie canina. Assim, tornou-se fundamental ampliar os conhecimentos sobre as características do sêmen canino, manipulação adequada do sêmen após a coleta e processamento que envolvem a criopreservação. Conseqüentemente, novos estudos foram conduzidos nesse âmbito e os resultados obtidos são promissores.

SILVA et al. (1996) relataram taxa de prenhez de 60% e ROTA et al. (1999) observaram taxa de 84%, para IA com sêmen congelado canino, ambos em condições experimentais. LINDE-FORSBERG et al. (1999) observaram taxas de prenhez com sêmen congelado de 72%, em um levantamento de dados de um programa reprodutivo canino, que foi conduzido entre 1983 a 1995.

A avaliação da qualidade do sêmen criopreservado em estudos *in vivo* é a análise mais recomendada e fidedigna do sêmen. Porém, os estudos *in vitro* estão bastante difundidos e permitem a avaliação de alguns atributos que o espermatozóide expressa, quando está apto a fecundar o ovócito. No entanto, alguns testes *in vitro* podem apresentar baixa correlação com a fertilidade (ROTA, 1998).

Novas técnicas têm sido introduzidas para a avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado e, entre elas pode-se citar os testes hipo-osmótico (avalia funcionalidade e integridade da membrana plasmática do espermatozóide), termo-resistência (avalia longevidade do espermatozóide), técnicas de coloração por fluorescência (avaliam integridade da membrana plasmática), além de técnicas mais sofisticadas, como taxa de penetração do espermatozóide em ovócitos desnudos de hamster. Constatou-se que esses testes, quando correlacionados com a fertilidade, apresentaram resultados satisfatórios (ROTA, 1998).

Desse modo, as perspectivas atuais na criopreservação de sêmen canino são de investigações consistentes e completas, visando à obtenção de material de alta qualidade, para permitir a elevação dos índices reprodutivos nessa espécie animal. O que, conseqüentemente, irá permitir a difusão do procedimento de criopreservação, seja no campo científico ou na reprodução comercial de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etapas do processamento do sêmen para criopreservação

2.1.1. Avaliação do sêmen

A concentração espermática canina normal pode variar de 200 milhões a 10 bilhões de espermatozóides no volume total do ejaculado. Porém, o valor médio é de 500 milhões de espermatozóides (SEAGER, 1986; JOHNSTON 1991; FELDMAN e NELSON, 1996). Esse número pode variar conforme idade do animal, peso testicular e atividade sexual. O número total de espermatozóides por dose inseminante, para o sêmen congelado, varia de 150 a 400 milhões de espermatozóides, quando a deposição do sêmen é feita intra-vaginal ou cervical superficial. Porém, se o sêmen destina-se a ser depositado no útero da cadela, esses valores podem ser bastante reduzidos (ANDERSEN, 1980; LINDEFORSBERG, 1995).

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 (LINDEFORSBERG, 1991; FELDMAN e NELSON, 1996).

Segundo ENGLAND (1993), 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.

Na espécie canina, uma amostra de sêmen, 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 esteja mais bem correlacionada com a fertilidade do que outros parâmetros de avaliação do sêmen (FELDMAN E NELSON, 1996).

Estudos sobre a morfologia espermática canina, tanto normal quanto patológica foram poucos (AUGHEY e RENTON, 1971; HRUDKA, 1983; RENTON et al., 1986; EDWARDS et al., 1992; OETTLÉ, 1993; AGUIAR et al. 1994, KAWAKAMI et al., 1998, BUENO et al., 1999). Porém, 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 e BRUCE, 1989).

MORTON e BRUCE (1989) conduziram um estudo sobre a avaliação seminal e a criopreservação do sêmen de cães e encontraram que algumas patologias do espermatozóide estão associadas com baixa motilidade espermática, após a descongelação. Entre essas patologias, estão defeitos na peça intermediária e cauda enrolada ou com fratura. Os autores sugerem ainda, que são necessários novos estudos, para se determinar quais defeitos espermáticos podem afetar a qualidade geral do sêmen, após a descongelação.

ENGLAND e ALLEN (1989) estudaram a qualidade seminal de 34 machos, relacionada com a fertilidade do sêmen e concluíram 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.

Observou-se que 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 e FORSBERG, 1993; LINDE-FORSBERG, 1995).

2.1.2. Diluição do sêmen

Todo sêmen deve ser acrescido de um meio diluidor antes da criopreservação. O diluidor auxilia na preservação da integridade da membrana plasmática, que pode sofrer alterações devido a mudanças de temperatura. Além disso, o diluidor contém fontes energéticas para o espermatozóide e estabiliza o pH do meio. 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).

A diluição do sêmen é essencial para o sucesso da técnica de criopreservação, pois os componentes dos meios diluidores fornecem condições para a sobrevivência do espermatozóide. O sêmen é diluído para alcançar uma concentração padrão, antes da congelação.

2.1.3. Componentes do meio diluidor

Os sistemas tampões devem ser um dos constituintes dos diluidores, pois o metabolismo dos espermatozóides resulta em produção de íons de hidrogênio, que tornam o meio ácido e devem ser neutralizados. Se os íons formados não forem removidos, o pH da solução diminui e a sobrevivência do espermatozóide fica reduzida, o que se nota pela diminuição da motilidade espermática progressiva. O pH ótimo para os espermatozóides é próximo da neutralidade.

Conseqüentemente, a maioria dos diluidores são tamponados com pH de 6,9 a 7,1 (Smith, 1984, citado por ENGLAND, 1993).

Estudaram-se vários meios diluidores para a preservação do sêmen canino e, entre outros aspectos, observou-se que o meio tampão citrato foi superior ao fosfato, para a sobrevivência dos espermatozóides (FOOTE e LEONARD, 1964). Ainda verificando os componentes de meios diluidores, FOOTE (1964) relatou que o tampão bicarbonato foi prejudicial para a sobrevivência dos espermatozóides.

Os meios tampões introduzidos mais recentemente são os íons dipolares, como o Tris (Tris-hidroximetil aminometano) e o Tes (N-tris(hidroximetil) metil 2-aminoetanossulfônico), associado ao citrato e à gema de ovo (Graham et al., 1972, citado por ENGLAND, 1993). Após a introdução desse tampão surgiram várias modificações que têm sido amplamente empregadas até a atualidade (SILVA e VERSTEGEN, 1995).

A gema de ovo, particularmente seus componentes fosfolípidos, possui ação protetora sobre membranas celulares e, por isso, tem sido acrescentada aos meios diluidores, com o intuito de conferir maior proteção às membranas do espermatozóide, durante o processamento do sêmen (ENGLAND, 1993).

Parece haver interação dos fosfolípidos da gema de ovo, com os constituintes das membranas espermáticas, através da ocupação, por parte desses lípidos, em sítios específicos da superfície das membranas, tornando-as mais resistentes. Assim, lesões primárias associadas ao choque térmico, principalmente aquelas que alteram a permeabilidade da membrana, podem ser prevenidas (QUINN et al., 1980; WATSON, 1981).

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

Os açúcares são adicionados ao meio diluidor como substratos exógenos de energia, além de componentes osmóticos. Os espermatozóides são capazes de glicolisar glicose, frutose e manose (Mann, 1964, citado por ENGLAND, 1993).

FOOTE (1964) e FOOTE e LEONARD (1964) observaram que o acréscimo de glicose em um meio diluidor foi capaz de aumentar o período de sobrevivência do espermatozóide canino. Os autores levantaram, por ocasião, a possibilidade de que a glicose exercia seu efeito favorável, por funcionar como uma fonte exógena de energia.

BARTLLET (1962), estudando os constituintes bioquímicos do sêmen do cão, observou que os espermatozóides caninos obtêm sua energia, primariamente, de processos glicolíticos. Apesar do sêmen canino possuir baixas concentrações de frutose, quando comparado ao sêmen de outras espécies de mamíferos, o espermatozóide é capaz de utilizá-la com eficiência, como fonte de energia.

Mais recentemente, componentes aditivos, como detergentes e aminoácidos têm sido adicionados ao meio diluidor. Parece que esses componentes fornecem melhores condições para a sobrevivência espermática, pois aumentam os índices reprodutivos (THOMAS et al., 1992). A adição do detergente dodecil-sulfato de sódio é benéfica, por esse composto atuar favorecendo a ação dos fosfolípídeos da gema de ovo e, assim, aumentar a proteção do espermatozóide contra choque térmico (THOMAS et al., 1992; ROTA et al., 1997).

O mecanismo de ação dos aminoácidos adicionados ao diluidor seria de proteger a célula agindo de modo semelhante ao glicerol, ou seja, 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. Utilizando-se prolina e glicina-betaine, como aditivos do meio diluidor Tris-frutose-ácido cítrico observou-se que a prolina exerce um efeito benéfico sobre vários parâmetros do sêmen, após a descongelação (PEÑA et al., 1998a).

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).

2.1.4. Meios diluidores para congelação de sêmen em caninos

Já foram testados diversos meios diluidores para a preservação do sêmen canino. De modo geral, os diluidores empregados no resfriamento do sêmen a 4°C e na congelação, são os mesmos, somente devendo-se acrescentar o agente crioprotetor para a criopreservação. O leite pasteurizado foi um dos primeiros meios diluidores descritos (Harrop, 1954, citado por LINDE-FORSBERG, 1991), seguindo-se a isso, vários meios foram desenvolvidos ou modificados, a partir dos meios utilizados para outras espécies animais (ENGLAND, 1993).

LINDE-FORSBERG (1991) sugere a utilização do meio Tris-citrato-20% de gema de ovo, com adição de antibióticos e glicerol. Inúmeros outros trabalhos foram conduzidos com a utilização desse mesmo diluidor, porém com formulações distintas (MORTON e BRUCE, 1989; THOMAS et al., 1992; ROTA et al., 1995; PEÑA et al., 1998b).

2.1.5. Centrifugação do sêmen

Segundo CUNHA e LOPES (1999), os ejaculados caninos apresentam grandes oscilações de volume e concentração espermática. Portanto, torna-se necessária a utilização de um método para amenizar tais variações e permitir a padronização do processo de congelação do sêmen.

Além disso, a incubação prolongada dos espermatozóides 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 e ALLEN, 1992). DOBRINSKI et al. (1993) também recomendaram a centrifugação do sêmen, visando a separação completa entre os espermatozóides e o plasma seminal.

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 unânime para todos os meios diluidores acrescentados ao sêmen e com a centrifugação sendo realizada por 15 minutos a 800G (CUNHA e LOPES, 1999).

A centrifugação do sêmen canino tem sido utilizada como uma das etapas do processamento do sêmen que vai 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

Os espermatozóides de diversas espécies requerem um intervalo de algumas horas antes de serem congelados, o que é conseguido durante os períodos de resfriamento e equilíbrio do sêmen, pois, aparentemente, é durante esse período que as células espermáticas adquirem resistência máxima aos efeitos da congelação (ENGLAND, 1993). Durante o resfriamento e o equilíbrio, os espermatozóides interagem com componentes da gema de ovo e com isso, adquirem resistência ao choque térmico e à criopreservação (BOUCHARD et al., 1990; WATSON, 1995).

De forma geral, os autores diferem pouco em suas citações, quanto ao tempo de resfriamento e de equilíbrio do sêmen. Relata-se algo em torno 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; YUBI et al., 1987; FERGUSON et al., 1989; OLAR et al., 1989; DOBRINSKI et al., 1993; FONTBONNE e BADINAND, 1993; WATSON, 1995; SILVA e VERSTEGEN, 1995; FARSTAD, 1996; STROM et al., 1997; MOURA et al., 1999). Porém, nos citados estudos, não foram descritas as curvas de resfriamento impostas e, segundo ENGLAND (1993), os valores são arbitrários, na maioria das vezes.

2.1.7. Criopreservação do sêmen

O processo de congelação deve ser realizado em diversas etapas e requer cuidados especiais para não haver perda na qualidade do material, sendo que esses cuidados estão diretamente relacionados com os princípios da criopreservação celular (ENGLAND, 1993).

As taxas de congelação são cruciais para a manutenção da viabilidade celular. Se a taxa for ótima e a membrana celular for permeável à água, ela torna-se progressivamente desidratada e é funcional após a descongelação. Quando as taxas de congelação não são ótimas, a perda de viabilidade das células está relacionada a vários eventos, como diminuição do conteúdo de água intracelular, com conseqüente aumento das concentrações de solutos intracelulares e precipitação desses solutos, levando a alterações de pH (WATSON, 1995).

O processo de criopreservação espermática representa uma interrupção artificial no progresso natural do espermatozóide até a fecundação, após a ejaculação. Mesmo as melhores técnicas atuais de preservação, alcançam, em média, cerca de 50% de viabilidade da população espermática. Além disso, a maioria dos espermatozóides viáveis possui características que os distinguem de antes da congelação (ROTA, 1998). O ciclo da criopreservação inclui o processo como um todo, desde a coleta e a diluição do sêmen, até a manutenção da capacidade funcional da célula, por um determinado período de tempo, após a descongelação (WATSON, 1995).

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).

Os crioprotetores devem ser substâncias de baixo peso molecular e de baixa toxicidade para as células. Os mecanismos de ação desses agentes são de promover a redução gradual da concentração de eletrólitos do meio extra-celular, protegendo a célula do efeito de solução durante a congelação, possibilitar a

saída gradual de água intracelular e, finalmente, permitir a estabilização das membranas celulares (VAN DER BERG e SOLIMAN, 1969; ALLER et al., 1995).

O glicerol, um agente crioprotetor permeável, é o mais utilizado na congelação do sêmen canino. Os melhores resultados de criopreservação de sêmen nessa espécie têm sido relatados com esse agente (ENGLAND, 1993).

Segundo DOEBBLER (1966), o glicerol é classificado como um soluto que se liga, fortemente, aos íons de hidrogênio na molécula da água e, por isso, sua atividade crioprotetora é considerada eficiente, pois torna mais lenta a desidratação osmótica a que a célula é submetida, durante a congelação.

A concentração ótima do glicerol varia com o diluidor, com o método de congelação e com a espécie animal em questão. Em cães, a concentração varia entre três a 11%, sendo que altas concentrações tendem a afetar a capacidade fecundante do espermatozóide (FOOTE e 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 com a redução da temperatura, durante a congelação, o seu efeito tóxico torna-se nulo.

FONTBONNE e BADINAND (1993) observaram os efeitos do glicerol sobre a motilidade espermática do sêmen canino, após a congelação, variando a concentração utilizada do agente, o método de adição e a temperatura de glicerolização. Não houve diferença na motilidade espermática quando foi empregado 3,2% e 6,4% de glicerol. Entretanto, na concentração de 1,6%, observou-se menor motilidade espermática.

Os mesmos autores relataram que o glicerol, adicionado ao meio em uma única etapa ou em várias e, tanto à temperatura ambiente, quanto a 5°C, não interferiu na qualidade espermática; sugerindo que a concentração mínima de glicerol, que irá conferir proteção aos espermatozóides canino, deva estar entre 1,6 a 3,2% e que o agente pode ser adicionado ao meio diluidor à temperatura ambiente e em etapa única, o que facilita o processamento do sêmen.

PEÑA et al. (1998b) e ROTA (1998) estudaram o efeito do glicerol sobre a qualidade espermática, em amostras de sêmen diluídas no meio Tris-

citrato. Os autores observaram que nas concentrações de 8% e 5% de glicerol, respectivamente, as amostras de sêmen apresentaram melhor qualidade espermática, considerando-se parâmetros como integridade de acrossoma e longevidade do espermatozóide.

Foi estabelecido que cada tipo celular tem uma taxa de congelação ótima para sobreviver à criopreservação e, com relação aos espermatozóides, foram determinadas várias taxas, que podem variar conforme a espécie animal em questão, o diluidor utilizado, o método de estocagem do sêmen e a concentração do crioprotetor no diluidor (WATSON, 1995).

Nos primeiros trabalhos desenvolvidos na congelação de sêmen canino utilizou-se tanto a congelação do sêmen em blocos de gelo seco (SEAGER, 1969), quanto a congelação em vapor de nitrogênio líquido (ANDERSEN, 1972). Porém, poucos foram os estudos que se preocuparam em definir a taxa de congelação que estava sendo imposta ao sêmen (ENGLAND, 1993).

Em um dos primeiros trabalhos em que se estudaram taxas de congelação do sêmen em cães, OLAR et al. (1989) avaliaram três taxas de congelação. Essas foram conseguidas tanto em vapor de nitrogênio líquido (taxa rápida de $-75^{\circ}\text{C}/\text{min}$), quanto em *freezer* programável (taxa moderada de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e taxa lenta de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$). As amostras de sêmen foram diluídas com o meio Tris-gema de ovo e analisadas quanto à motilidade espermática. Encontraram-se melhores resultados com a taxa de congelação moderada, quando a concentração final de glicerol no meio era de dois a 4%.

DOBRINSKI et al. (1993) avaliaram o efeito de três taxas de congelação sobre a viabilidade do sêmen canino, que foi diluído com quatro meios (Tris, Triladyl, IMV-Universal e Pipes) e envasado em palhetas de 0,5 ml, após resfriamento por uma hora e equilíbrio por 30 minutos. A motilidade espermática mais elevada (33%), após a descongelação, foi observada com a taxa de resfriamento lenta ($-5,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 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 congelação, obtidas por diferentes métodos (*freezer* programável ou vapor de nitrogênio líquido), em um

estudo sobre criopreservação do sêmen canino. As amostras de sêmen foram diluídas com o meio Tris-citrato-gema de ovo, com 4% de glicerol. Os melhores resultados, no que diz respeito à motilidade e vigor espermáticos e integridade de acrossoma após a descongelação, foram observados com as taxas de -12 e -28°C/minuto, iniciando em 0 até -70°C.

O sêmen canino é comumente congelado no vapor de nitrogênio líquido, por ser mais prático, demonstrar melhor custo-benefício que outras técnicas e, ainda, ter sucesso já comprovado. Porém, para melhor controle nas mudanças de temperatura e obtenção de taxas de congelação com maior repetibilidade, o emprego de um *freezer* programável é recomendado (ROTA, 1998).

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

WATSON (1995), considerando as causas das lesões celulares durante a criopreservação, observou que as células criopreservadas podem ser lesionadas durante a descongelação. Nessa etapa do processo, a célula está exposta ao fenômeno de recristalização migratória, que é a reorganização de micro-cristais de gelo em cristais maiores, que podem lesar a membrana plasmática das células.

Se a taxa de congelação empregada for rápida (formam-se mais cristais de gelo), deve-se realizar a descongelação rápida (HAMMERSTEDT et al., 1990), para a dissolução dos cristais, antes da ocorrência da recristalização migratória, que causa grandes danos à membrana plasmática e organelas celulares. Além disso, aparentemente, os espermatozóides são mais sensíveis à entrada de água através da membrana plasmática, que ocorre na descongelação, do que à saída de água, que ocorre na congelação (WATSON, 1995).

Assim, a fase de descongelação é uma etapa tão importante quanto a congelação para a sobrevivência da célula. Os resultados obtidos com diferentes taxas de descongelação para o sêmen canino são contraditórios, indicando que deve haver diferenças entre os métodos ideais de descongelação, relacionados às várias técnicas de congelação (ROTA et al., 1998).

Os pesquisadores adotaram várias temperaturas de descongelação em seus protocolos de criopreservação do sêmen canino. A descongelação rápida (70°C por seis a 8 segundos ou 55°C por 30 segundos) foi citada por FERGUSON et al. (1989), WILSON (1993), SILVA e VERSTEGEN (1995), HAY et al. (1997) e PEÑA et al. (1998b). Enquanto a descongelação lenta (37 a 38°C, por um a dois minutos), foi utilizada por DOBRINSKI et al. (1993) e FONTBONNE e BADINAND (1993).

OLAR et al. (1989) observaram que a taxa de descongelação rápida (75°C por doze segundos) foi superior quanto à motilidade espermática, após a descongelação, quando comparada a taxa de 35°C por 30 segundos.

IVANOVA-KICHEVA et al. (1995) utilizaram duas taxas de descongelação (37°C por oito segundos e 55°C por cinco segundos), para o sêmen canino e relataram que, com a taxa mais rápida, a viabilidade (motilidade e longevidade) dos espermatozóides foi superior, sugerindo que o rápido aumento na temperatura tenha impedido a formação de cristais de gelo maiores dentro da célula.

Por outro lado, Yubi (1984) citado por ENGLAND (1993), testou três taxas de descongelação para o sêmen de cão e encontrou maior declínio na motilidade espermática e na porcentagem de espermatozóides vivos, nas amostras descongeladas através da taxa rápida (75°C por seis segundos), que nas amostras descongeladas com a taxa lenta (37°C por dois minutos).

Mais recentemente, ROTA et al. (1998) testaram duas taxas de descongelação (38°C por 15 segundos e 70°C por oito segundos) em sêmen canino. Observaram que a descongelação rápida permitiu maior longevidade dos espermatozóides, durante incubação a 38°C, quando comparada à taxa lenta de descongelação. A maior longevidade dos espermatozóides que são submetidos a taxas rápidas de descongelação foi, anteriormente, observada por England (1992) citado por ROTA et al. (1998), por meio da realização do teste de termo-resistência.

2.2. Métodos de análise do sêmen criopreservado

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 e HAMMERSTEDT, 1993). A IA 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).

No entanto, as análises *in vivo* requerem um número grande de animais para serem avaliadas 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).

Por outro lado, os métodos de análise *in vitro* podem ser empregados para avaliar algumas das características que os espermatozóides férteis detêm. No entanto, a previsão da capacidade fecundante de amostras de sêmen pode não ser muito precisa, somente com a utilização desses métodos de análise (AMANN e HAMMERSTEDT, 1993). Quando os métodos *in vitro* são usados em conjunto, aumenta-se a acurácia em predizer o potencial de fertilidade do sêmen criopreservado (ROTA, 1998).

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

Nos primeiros estudos em que se empregou o sêmen congelado para a IA na espécie canina, os índices reprodutivos obtidos foram bastante baixos. GIL et al. (1970) obtiveram taxa de prenhez nula, o mesmo sendo relatado por

ANDERSEN (1972), sendo que ambos os autores utilizaram amostras seminais que apresentavam cerca de 50% de motilidade após a descongelação. O último autor relatou a prenhez de uma única cadela, quando inseminada pela via intra-uterina.

SEAGER et al. (1975) apresentaram dados de estudos realizados entre 1969 a 1974, sobre a IA com sêmen congelado em caninos. As amostras de sêmen foram diluídas em lactose-gema-de-ovo com glicerol e a via de inseminação utilizada (nas cadelas) foi a intravaginal. A taxa de prenhez obtida foi de 38,7%, nas 156 cadelas incluídas no estudo, valores esses, superiores aos relatados anteriormente, porém, ainda distantes do ideal.

Cerca de dez anos depois, FARSTAD (1984) relatou os resultados da IA em 25 cadelas, com sêmen congelado. A motilidade espermática do sêmen descongelado, estava entre 30 a 70% e a taxa de prenhez obtida foi de 67%, quando a inseminação foi realizada pela via intra-uterina e de 25%, quando realizada pela via intra-vaginal. Demonstrando assim, que o local de deposição do sêmen limita a aplicabilidade da inseminação com sêmen congelado.

Em programas mais recentes de IA com sêmen congelado, as taxas de prenhez foram de 41,5% para 65 cadelas inseminadas pela via transcervical. Observou-se, ainda, que, com a utilização de amostras de sêmen de baixa qualidade, não se alcançava prenhez positiva. No entanto, quando foi utilizado sêmen de ótima qualidade e as fêmeas estavam em momento propício para a inseminação, a taxa de prenhez elevou-se para 69% (LINDE-FORSBERG e FORSBERG, 1989).

Em um estudo realizado com 57 cadelas, que foram submetidas à inseminação artificial com sêmen congelado, diluído em meio a base de Tris-gema de ovo e glicerol, 52,6% tornaram-se gestantes com inseminação intravaginal e 73,6% com inseminação via transcervical, demonstrando influencia da via de inseminação utilizada (FONTBONNE e BADINAND, 1993). Ainda, os autores não relataram o número de machos utilizados no experimento.

Vários trabalhos relatam taxas de prenhez entre 60 a 80%, tanto para a IA pela via intra-uterina, quanto intra-vaginal com sêmen congelado (WILSON, 1993; NOTHLING et al., 1995; SILVA e VERSTEGEN, 1995; SILVA et al., 1996; NOTHLING et al., 1997). Nos trabalhos citados, as amostras seminais apresentavam motilidade espermática, após a descongelação, de cerca de 60% e são todos relatos de índices obtidos em pesquisas, em condições controladas.

ROTA et al. (1999) relataram a IA por deposição vaginal ou uterina do sêmen congelado, em vinte e cinco cadelas, que haviam sido acompanhadas em ciclos estrais anteriores. As amostras de sêmen foram diluídas com meio Tris-gema de ovo, contendo 5% de glicerol. A taxa de prenhez obtida foi de 84%, que, segundo os autores, está muito próxima daquelas encontradas em monta natural.

LINDE-FORSBERG et al. (1999) compilaram dados sobre índices reprodutivos obtidos a campo no âmbito de IA em cães, no período entre 1983 até 1995 e apresentaram o resultado de 327 inseminações com sêmen congelado, provenientes de diferentes fontes. A taxa de prenhez obtida foi de 70%, aproximadamente, com a motilidade espermática após a descongelação maior que 40%. Esses dados demonstram aumento nos índices reprodutivos com IA em cães, ao longo dos últimos vinte e cinco anos.

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

As análises *in vitro* do sêmen devem avaliar a função espermática, isto é, avaliar a célula como estando apta ou não para realizar a fecundação do ovócito, semelhante ao que seria avaliado em estudos *in vivo*. 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 espermatozóide (ROTA, 1998).

Segundo AMANN (1989), é aceitável que aferições objetivas da motilidade espermática, condição de acrossoma e outras características do sêmen estejam, significativamente, correlacionadas com a fertilidade. Porém, os

espermatozóides férteis devem manter e expressar uma série de características, que incluem desde estrutura normal de seus componentes funcionais até estabilização de seu conteúdo de DNA, passando pela manutenção da viabilidade da membrana plasmática (HAMMERSTED et al., 1990). Assim, pode-se supor que todas as características presentes em um espermatozóide fértil não são avaliadas ao mesmo tempo, nas análises *in vitro* do sêmen.

A motilidade e o vigor espermáticos são critérios importantes na avaliação da qualidade seminal, pois os espermatozóides precisam estar móveis e obterem hiper-atividade, quando na tuba uterina, para alcançar o ovócito e penetrar nas suas camadas de revestimento (AMANN, 1989). No entanto, mesmo que a estimativa subjetiva da motilidade, em um microscópio de contraste de fase, demonstre repetibilidade, com um mesmo observador, torna-se difícil comparar resultados entre diferentes laboratórios (AMANN, 1989; ROTA, 1998).

A motilidade e o vigor espermáticos foram, durante muito tempo, os únicos parâmetros empregados para a avaliação da integridade dos espermatozóides, após qualquer processamento do sêmen, 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).

Segundo ENGLAND (1993), os espermatozóides podem apresentar motilidade espermática alta após a congelção, mas não serem férteis, devido a danos em outras estruturas, como o acrossoma, assim, se fazem necessárias outras análises do sêmen. SILVA e VERSTEGEN (1995) observaram tal fato, quando congelaram sêmen de cão e notaram que as amostras de sêmen que obtiveram motilidade mais alta, após a descongelção, não corresponderam às amostras que alcançaram as mais elevadas taxas de prenhez na IA.

A integridade bioquímica da membrana plasmática e do acrossoma é essencial para a função espermática. Tanto os processos metabólicos que envolvem a motilidade espermática, quanto os eventos que antecedem a fecundação são dependentes da funcionalidade das membranas celulares. Como exemplos desses eventos pode-se incluir a capacitação espermática, a reação acrossômica e, ainda, a interação do espermatozóide à superfície do ovócito, culminando na união dos gametas masculino e feminino (JEYENDRAN et al., 1984; ZAVOS, 1991; JEYENDRAN et al., 1992; JEYENDRAN e ZANELVELD, 1993).

Uma das propriedades da membrana celular é o transporte seletivo de moléculas, que pode ser observado quando a célula é exposta a condições hipo-osmóticas, permitindo a entrada de água, através da membrana plasmática, para o meio intracelular, até atingir um equilíbrio osmótico. Esse mecanismo ocorre somente nas células com a membrana plasmática viável e devido ao influxo de água, ocorre edema celular, que causa um balonamento da membrana plasmática da região da cauda. Os filamentos do axonema da cauda têm sua disposição alterada, por estarem intimamente relacionados com a membrana plasmática. Assim, a cauda do espermatozóide perde sua estrutura típica e ocorre um evidente enrolamento dessa região. A membrana plasmática da região da cauda dos espermatozóides parece apresentar maior susceptibilidade a condições hipo-osmóticas, por isso nota-se o edema celular (JEYENDRAN et al., 1984; 1992).

JEYENDRAN et al. (1984) empregaram o teste hipo-osmótico (HOS-T) na espécie humana, para avaliação da qualidade do sêmen em pacientes sub-férteis e também correlacionaram esse teste com outras características do sêmen. Concluiu-se que o teste hipo-osmótico parece ter alta repetibilidade e acurácia e, ainda, ter correlação positiva com os testes de capacitação espermática e de penetração do espermatozóide em ovócitos desnudos de hamster, sendo que esses testes demonstram a capacidade fecundante *in vitro* dos espermatozóides.

Os mesmos autores, após a repetição de vários testes, observaram que a solução de frutose e ácido cítrico de 150 mosmol foi a ideal para a realização do teste hipo-osmótico em humanos e o período de incubação recomendado foi de

30 minutos. Relatou-se ainda, que nas amostras controle (incubação em solução iso-osmótica) observou-se cerca de três a 5% de espermatozóides com a cauda enrolada.

KUMI-DIAKA (1993) utilizou o teste hipo-osmótico no sêmen canino, para determinar a resposta dos espermatozóides ao teste e para associá-la a outros parâmetros do sêmen. Observaram-se, ainda, os efeitos do aquecimento e da preservação do sêmen, sobre o resultado do teste. Para tal, foram testadas diferentes soluções hipo-osmóticas e a recomendada foi a de 60 mosmol 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 a descongelação. Além disso, obteve-se uma alta correlação entre o HOS-T e a motilidade espermática das amostras, o que pode ser explicado pelo fato de a motilidade espermática ser, parcialmente, dependente da integridade da membrana plasmática (KUMI-DIAKA, 1993).

ENGLAND e PLUMMER (1993) investigaram o edemaciamento dos espermatozóides canino, sob condições hipo-osmóticas e estabeleceram a relação com a aparência ultra-estrutural observada. Relatou-se que a utilização de uma solução de 150 mosmol (75% de frutose e 25% de citrato de sódio) permitiu a melhor observação do enrolamento da cauda. Em estudos ultra-estruturais observou-se que, ao decorrer do teste, ocorre um balonamento da membrana plasmática da região da cauda espermática, com conseqüente flexão dos filamentos axiais do axonema. Além disso, a microscopia eletrônica revelou que os espermatozóides com membrana plasmática lesionada são incapazes de responder ao teste.

RODRIGUEZ-GIL et al. (1994) testaram várias soluções hipo-osmóticas e vários períodos de incubação, para a realização do HOS-T no sêmen canino e concluíram que a solução de 100 a 150 mosmol por 45 a 60 minutos de

incubação, é a indicada para a realização do teste, pois induz ao enrolamento da cauda, sem alterar a viabilidade da célula. Relataram, ainda, que houve uma correlação positiva entre o HOS-T e outros parâmetros do sêmen, como motilidade espermática.

Entre diversos estudos, conduzidos em diferentes espécies, concluiu-se que o teste hipo-osmótico é útil para identificar machos que são sub-férteis, a despeito de possuírem um espermiograma normal e também é útil em selecionar sêmen preservado para IA. Observou-se, ainda, que existe correlação significativa entre o teste hipo-osmótico e alguns outros parâmetros do sêmen fresco e criopreservado para várias espécies, inclusive a canina (VAN DER VEN et al., 1986; CHECK et al., 1991; ZAVOS, 1991; JEYENDRAN et al., 1992; KUMI-DIAKA e BADTRAM, 1994; YAVETZ et al., 1995; PEREZ et al., 1997; VASQUEZ et al., 1997; HOSSAIN et al., 1998; IANAMASSU et al., 1999; MELO, 1999; NEILD et al., 1999).

Assim, este teste vem sendo utilizado, mais recentemente, em várias espécies devido à facilidade de sua execução e a comprovação do HOS-T estar bem correlacionado com outros parâmetros do sêmen (MC LAUGHLIN et al., 1992; ROTA et al., 1995; CHECK et al., 1991; ENGLAND e PONZIO, 1996; ESTEVES et al., 1996; HAY et al., 1997; SODERQUIST et al., 1997).

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 à presença de membrana plasmática com alguma alteração (JEYENDRAN et al., 1984; ZAVOS, 1991; JEYENDRAN et al., 1992; ENGLAND e 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. Isso porque a reação acrossômica precisa estar ocorrendo em sincronismo com o momento da fecundação e se o acrossoma apresentar lesões, pode inviabilizar a reação. Após sua ocorrência é que os espermatozóides adquirem novas habilidades, como de penetração na zona pelúcida e de fundir-se com a membrana plasmática do ovócito. Como as membranas acrossomais podem sofrer lesões durante o processamento do sêmen, faz-se necessário a avaliação de sua integridade para prever a qualidade do sêmen preservado (CROSS e MEIZEL, 1989).

OETTLÉ (1986) levantou o fato de que o melhor método para avaliar a qualidade do sêmen criopreservado, continua sendo o *in vivo*, com a observação das taxas de prenhez obtidas via IA. No entanto, devido ao longo intervalo do ciclo estral das cadelas, a coleta desses resultados consiste em um processo prolongado. Assim, muitos métodos *in vitro* foram desenvolvidos, com intuito de prever a fertilidade do sêmen e o mais confiável deles parece ser a análise da integridade do acrossoma.

CROSS e 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.

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 espermatozóides (CROSS e MEIZEL, 1989).

OETTLÉ (1986) utilizou o corante comercial Spermac para avaliar a integridade do acrossoma, durante a criopreservação do sêmen em cães e encontrou que houve um decréscimo no número de espermatozóides com acrossoma íntegro, nas várias etapas do processamento. Esse decréscimo foi mais acentuado após a descongelação do sêmen, quando se observou apenas 20% de

acrossomas íntegros, contra 85% nas amostras de sêmen após a diluição. Não houve correlação entre a motilidade espermática e o número de espermatozóides com acrossoma íntegro.

IVANOVA-KICHEVA et al. (1995) relataram resultados sobre a avaliação do acrossoma, em amostras de sêmen que foram submetidas a congelamento, com três diferentes diluidores. A observação do acrossoma foi feita após coloração das amostras com vermelho congo e violeta genciana (método de Serovski) e a visualização em microscopia ótica convencional. Após a descongelamento, a porcentagem de acrossomas íntegros estava em torno de 47%, sendo que, inicialmente, essa era superior a 70%. Os acrossomas foram as estruturas celulares mais sensíveis à criopreservação, apresentando vários graus de edema ou estando até mesmo ausentes.

ENGLAND e PONZIO (1996) estudaram a qualidade espermática do sêmen canino criopreservado, através da observação de vários parâmetros do sêmen, inclusive a condição do acrossoma. Observaram que 52 a 80% dos espermatozóides estavam com o acrossoma normal após a descongelamento, sendo que os valores iniciais foram de 82 a 96%.

HAY et al. (1997) realizaram um estudo para determinar o melhor método para a criopreservação do sêmen canino e, para tal, analisaram alguns parâmetros do sêmen, entre eles, a condição do acrossoma. Utilizaram o corante comercial Spermac e observaram, em microscopia ótica convencional, que o número médio de espermatozóides, no sêmen fresco, com acrossoma íntegro foi de 95% e, após a descongelamento, de 23%.

PEÑA et al. (1998a) e PEÑA et al. (1998b) avaliaram a integridade do acrossoma dos espermatozóides canino criopreservados, através de microscopia de contraste de fase. A porcentagem de acrossomas íntegros, após a criopreservação, foi de 52% e de 58%, respectivamente.

ROTA (1998) avaliou a integridade de acrossoma após a criopreservação do sêmen de cão, através da coloração com o corante comercial Spermac e observou o acrossoma em microscopia ótica convencional. Relatou-se que cerca de 45% dos espermatozóides 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 forem pequenas, os espermatozóides poderiam manter sua capacidade fecundante.

A avaliação da longevidade dos espermatozóides *in vitro* se realiza através do teste de termo-resistência (TTR). A manutenção do sêmen incubado à temperatura semelhante à corporal, que é o princípio do TTR, parece ser um dos métodos mais eficientes, na aferição da qualidade espermática, após o processamento do sêmen. O objetivo do teste é mimetizar as condições em que o espermatozóide é submetido nos órgãos reprodutores femininos (ENGLAND, 1993).

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 e 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 canino congelado e que foi diluído com Tris-gema de ovo e 4% de glicerol, observaram que a motilidade espermática, imediatamente após a descongelação, 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 a descongelação.

Considerando que a sobrevivência do espermatozóide após a descongelação, durante a incubação à temperatura corporal, é um importante parâmetro para a estimativa da capacidade fecundante espermática, utilizou-se o TTR em amostras de sêmen que foram diluídas em Tris-citrato-glicose, com 5% de glicerol. A motilidade espermática após a descongelação foi de 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).

CAPÍTULO 1

QUALIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN CANINO CRIOPRESERVADO. I - UTILIZAÇÃO DE DOIS MEIOS DILUIDORES

1. INTRODUÇÃO

A diluição do sêmen é essencial para o sucesso da técnica de criopreservação, pois os componentes dos meios diluidores fornecem condições para a sobrevivência dos espermatozóides, auxiliando na preservação da integridade da membrana plasmática, que pode sofrer alterações devido mudanças de temperatura. Além disso, os diluidores contém fontes energéticas para os espermatozóides e estabilizam o pH do meio (LINDE-FORSBERG, 1991; ENGLAND, 1993).

Segundo SILVA e VERSTEGEN (1995), entre os diversos fatores que são críticos para a congelação de sêmen, o meio diluidor merece consideração. Os meios diluidores utilizados nos primeiros relatos de prenhez com sêmen congelado em cães, foram a base de lactose (SEAGER, 1969) e Tris-citrato-gema de ovo (ANDERSEN, 1972).

OLAR et al. (1989) relataram 40% de motilidade espermática com o diluidor Tris-gema de ovo, enquanto DOBRINSKI et al. (1993) consideraram todos os diluidores testados (Pipes, Tris, IMV-Universal e Triladyl) passíveis de serem empregados para a criopreservação em caninos, relatando motilidade espermática média de 28%, após a descongelação do sêmen.

SILVA e VERSTEGEN (1995) empregaram três diluidores (Laiciphos, Biociphos e Tes-Tris com 4% de glicerol) na congelação do sêmen de cão. A motilidade espermática no sêmen fresco foi de 95%, em média e após a descongelação foi de 65%, para os diluidores Laiciphos e Tes-Tris. Já para o Biociphos foi de 50%. Observaram-se taxas de prenhez de 60%, para os dois primeiros diluidores e de 100%, para o Biociphos. Considerando-se que o método de IA nas cadelas foi o intra-uterino com todos os diluidores, os autores sugeriram que apenas a avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado, pode não ser o melhor indicativo da qualidade espermática e ainda, consideraram os resultados de taxas de prenhez satisfatórios para a espécie canina.

OLIVEIRA et al. (1999) utilizando dois diferentes diluidores (Tris-gema de ovo e Lactose-gema de ovo) na congelação do sêmen canino, observaram que não houve diferença entre os dois diluidores, quanto à motilidade e ao vigor espermáticos, em condições experimentais.

Recentemente, entre os meios diluidores mais utilizados, está o Tris-citrato-gema de ovo, com variações do mesmo diluidor, quanto aos açúcares e outros componentes e, principalmente, quanto à concentração de glicerol (FONTBONNE e BADINAND, 1993; ROTA et al., 1998; SIRIVAIDYANPONG et al., 2000). Além disso, têm-se empregado esse mesmo diluidor, com o acréscimo de aditivos, como detergentes ou aminoácidos, que aumentam a viabilidade dos espermatozóides (THOMAS et al., 1992; ROTA, 1998; PEÑA et al., 1998a; ROTA et al., 1999).

O objetivo desse trabalho foi avaliar os meios diluidores Tes-Tris e Tris-citrato, ambos com 4% de glicerol, utilizados para a criopreservação do sêmen canino, quanto a seus efeitos sobre a qualidade espermática *in vitro*. Os parâmetros utilizados para a avaliação do sêmen foram motilidade espermática

progressiva e vigor espermático, integridade da membrana plasmática, por meio de teste hipo-osmótico, avaliação da integridade do acrossoma, por meio de preparação úmida e ainda, longevidade do espermatozóide, por meio do teste de termo-resistência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados três cães, clinicamente sadios, com idade de dois, três e seis anos, da raça Labrador do Retriever. Os animais foram mantidos, durante todo o procedimento experimental, sob condições normais de manejo alimentar.

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 e NELSON, 1996).

A coleta de sêmen foi realizada em intervalos semanais, pelo método de manipulação digital. Foram cinco coletas para cada macho, totalizando quinze coletas, para o procedimento experimental. As coletas foram realizadas em ambiente apropriado e sempre no mesmo local. Para a coleta foram utilizados tubos de centrífuga de plástico 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.

As frações do ejaculado coletadas foram a primeira e a segunda (fração espermática), sendo que, imediatamente após o término da ejaculação da segunda fração, o tubo de centrífuga foi incubado a 37°C, em banho-maria digital¹, com agitador automático. A terceira fração foi coletada em outro recipiente, até o término completo da ejaculação.

¹ Tecnal.

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).

A mensuração da concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se sêmen diluído na proporção de 20 µL em 4,0 mL 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 por mL, ambos em mililitros (FELDMAN e NELSON, 1996).

Uma alíquota de sêmen de 20 µL foi colocada em uma lâmina de vidro, coberta com uma lamínula de vidro, ambas mantidas à temperatura de 37°C, em placa aquecedora, para a observação da motilidade progressiva dos espermatozóides, realizada, individualmente, 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 individual, em microscopia óptica de contraste de fase, em aumento de 200 vezes, atribuindo-se escala de 0 a 5, entre os valores mínimos e máximos observados, respectivamente (CBRA, 1998).

Após a avaliação, o sêmen obtido de cada ejaculado foi dividido em duas frações iguais, sendo cada uma delas diluída em cada um dos meios diluidores: Tris-citrato (ROTA et al., 1995; modificado) e Tes-Tris (SILVA e VERSTEGEN, 1995; modificado) (Tabela 1).

O sêmen foi pré-diluído em um dos meios diluidores descritos na proporção de um volume de sêmen para um volume de diluidor. Após a pré-diluição, foram retiradas amostras de sêmen para os testes *in vitro* e o sêmen foi centrifugado por seis minutos a 700 g, para retirada do líquido seminal e padronização das amostras.

² Olympus – CBA.

Tabela 1 - Composição dos meios diluidores Tris-citrato e Tes-Tris, utilizados para a diluição do sêmen, nos diferentes tratamentos

Diluidor	Tris-citrato^A	Tes-Tris^B
Tes (g) (N-tris(hidroximetil) metil 2-aminoetanosulfônico)	—	4,4
Tris (g) (T-hidroximetilaminometano)	3,025	2,3
Ácido Cítrico (g)	1,70	—
Frutose (g)	1,25	—
Glicerol %	4	4
Gema de ovo %	20	20
Estreptomicina (mg/l)	1	1
Água Destilada - qsp (ml)	100	100

A - ROTA et al. (1995).

B - SILVA e VERSTEGEN (1995).

Após a centrifugação e retirada do líquido sobrenadante, as amostras de sêmen foram rediluídas com os meios diluidores Tris-citrato ou Tes-Tris, conforme descrito na pré-diluição. O volume do diluidor acrescentado foi suficiente, para o ajuste da concentração total de espermatozóides, de 100 milhões por mL.

O sêmen foi envasado, imediatamente após a rediluição, em palhetas de acetato de polietileno de 0,5 mL, previamente identificadas e mantidas aquecidas. Todo o processamento inicial do sêmen expendeu, no máximo, 30 minutos, até que o sêmen fosse submetido ao resfriamento.

Para o resfriamento, as palhetas contendo o sêmen foram colocadas em um frasco de vidro pré aquecido e medindo 15 cm 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 1250 mL de água a 37°C. Com esse procedimento, o frasco de vidro com as palhetas foi submetido ao resfriamento, em água a 37°C.

Ambos os recipientes, foram, então, acondicionados dentro de uma caixa de isopor, que possuía um espaço para fixar o recipiente de plástico e 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 8,0 litros de gelo e água, volume esse, pré-definido, para se atingir, de modo aproximado, a curva de resfriamento desejada.

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°C/min., não sendo 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 min, a aproximadamente 4°C, na mesma caixa de isopor (período de equilíbrio).

A congelação foi realizada 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 para a congelação final do sêmen. 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.

A descongelação do sêmen foi realizada em banho-maria a 37°C, por 50 segundos e logo após o sêmen foi retirado das palhetas e transferido para frascos *ependorf* de 1,5 mL e foram mantidos incubados a 37°C, para serem

avaliados. A descongelação foi feita entre uma semana até, aproximadamente, um mês, após a congelação.

As amostras do sêmen, diluídas com ambos os diluidores sob estudo, foram avaliadas após a coleta, a pré-diluição, o período de resfriamento e o equilíbrio e a descongelação. A motilidade espermática progressiva e o vigor espermático foram avaliados segundo a metodologia descrita anteriormente.

A integridade da membrana plasmática foi avaliada em todas as etapas, por meio do teste hipo-osmótico (HOS-T), utilizando 1,0 mL de uma solução com frutose na concentração de 60 mosm/Kg, acrescida de 0,1 mL de sêmen. Essa solução foi incubada por 45 minutos, em banho-maria a 37°C. Após esse período, uma amostra da solução de 20 µL foi colocada em câmara de Neubauer e seguiu-se a contagem de 200 espermatozóides, em microscopia de contraste de fase, em aumento de 200x. As células foram classificadas quanto a presença ou não de cauda enrolada. O resultado foi determinado em porcentagem (KUMIDIKA, 1993).

A integridade do acrossoma foi avaliada em amostras de sêmen retiradas e conservadas em solução de formol-salina tamponado (HANCOCK, 1957). A observação da condição de acrossoma foi realizada em 200 espermatozóides, em microscopia de contraste de fase³, em aumento de 1.000x (MIES FILHO, 1982). Classificaram-se os espermatozóides quanto à integridade ou não do acrossoma, incluindo desde edema e desprendimento até ausência de acrossoma.

A longevidade dos espermatozóides foi avaliada nas amostras de sêmen, por meio do teste de termo-resistência (TTR). O teste consistiu em colocar uma amostra de sêmen de 0,2 mL, em um frasco *ependorf* de 1,5 mL, 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; modificado).

As características estudadas foram submetidas ao teste de normalidade (Teste de LILLIEFORS) e homocedasticidade (Teste de COCHRAN e

³ Olympus - BX50.

BARTLETT). Posteriormente, foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA). As médias que apresentaram significância foram submetidas às comparações de médias, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Foram realizadas correlações de Pearson entre os testes *in vitro* aplicados às amostras de sêmen. Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico SAEG (EUCLYDES, 1982).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se na Tabela 2 que as características seminais dos animais incluídos nesse experimento estavam condizentes com os parâmetros considerados normais, para a espécie canina (SEAGER, 1986, JOHNSTON, 1991, LINDE-FORSBERG, 1991, FELDMAN e NELSON, 1996). Considerou-se, portanto, que os cães estavam em condições de serem doadores de sêmen para a experimentação.

Não foi observada diferença ($P>0,05$) na motilidade progressiva dos espermatozóides após a diluição e o resfriamento do sêmen, entre os diluidores. No entanto, após a congelação/descongelação das amostras de sêmen, a motilidade espermática foi maior com o diluidor Tris-citrato ($P<0,05$) que com o diluidor Tes-Tris (Tabela 3).

Na avaliação do vigor dos espermatozóides, observou-se que após a diluição e o resfriamento do sêmen, o vigor espermático foi maior nas amostras submetidas ao meio diluidor Tes-Tris ($P<0,05$), exceto, após a congelação/descongelação em que o vigor foi mais elevado para as amostras de sêmen diluídas no meio Tris-citrato ($P<0,05$) (Tabela 3).

Tabela 2 - Características seminais de cães da raça Labrador do Retriever, doadores de sêmen, para experimentação em criopreservação espermática

Características	Animais		
Seminais	Cão 01	Cão 02	Cão 03
Volume	4,6 ± 0,28 ml	4,0 ± 1,15 ml	2,0 ± 0,28 ml
Coloração	marfim	marfim	marfim
Motilidade	90 ± 11,54%	90 ± 7,63%	85 ± 5,0%
Vigor	4 ± 0,28	4 ± 0,28	4 ± 0,5
Concentração	220.10 ⁶ ± 43,58 sptz/ml	210. 10 ⁶ ± 26,45 sptz/ml	250. 10 ⁶ ± 76,37 sptz/ml
Morfologia			
Defeitos menores	6 ± 1,57%	14 ± 1,52%	9,5 ± 1,52%
Defeitos maiores	7 ± 0,83%	4 ± 0,72%	8,0 ± 0,63%
Defeitos Totais	13 ± 1,23%	18 ± 1,08%	17,5 ± 1,03%

Tabela 3 - Valores médios (X) e coeficiente de variação (CV) da motilidade (%) espermática progressiva e vigor espermático e em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes diluidores para a criopreservação

	Sêmen fresco			Diluidor	Sêmen diluído			Sêmen resfriado			Sêmen congelado		
	X	CV	D		X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D
Motilidade	93,6	2%	3,01	Tris-citrato	90,6a	2%	2,58	82,6a	3%	3,19	64,0a	11%	7,12
				Tes-Tris	92,6a	4%	2,58	81,6a	2%	2,43	40,6b	23%	9,61
Vigor	4,4	14%	0,63	Tris-citrato	4,0a	14%	0,59	3,2a	12%	0,41	3,8a	10%	0,41
				Tes-Tris	4,6b	10%	0,50	3,4b	14%	0,50	2,0b	26%	0,53

As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si (P<0,05), pelo Teste de Tukey.

Os valores obtidos de motilidade e vigor espermáticos do sêmen congelado/descongelado foram semelhantes aos de SILVA e VERSTEGEN (1995), PEÑA et al. (1998a), WILSON (1993), STROM et al. (1997) e ROTA, (1998), sendo que esses autores utilizaram diferentes diluidores e concentração de glicerol nos meios.

No entanto, foram superiores aos encontrados por OLAR et al. (1989), THOMAS et al. (1993) e DOBRINSKI et al. (1993), que encontraram motilidade espermática, após a descongelação, em torno de 27%, enquanto a motilidade média dos espermatozóides nos diluidores Tris-citrato e Tes-Tris foi de 52% no presente experimento. Os autores citados utilizaram protocolos distintos de congelação, como diferentes concentrações de glicerol no diluidor (OLAR et al., 1989), diferentes métodos de envasamento do sêmen (THOMAS et al., 1993) e diferentes taxas de congelação (DOBRINSKI et al., 1993).

Considerando-se o diluidor Tris-citrato separadamente, esse tem sido empregado em diversos trabalhos, com resultados próximos aos observados no presente experimento, quanto a motilidade e vigor espermáticos (THOMAS et al., 1993; STROM et al., 1997; ROTA et al., 1998).

O diluidor Tes-Tris foi testado por SILVA e VERSTEGEN (1995) em caninos e por JEDRZEJCZAK et al. (1996) em humanos, mostraram motilidade espermática, após a descongelação de 65% e 54,8%, respectivamente, resultados esses superiores ao encontrado nesse experimento. No trabalho desenvolvido por SILVA e VERSTEGEN (1995) o período de resfriamento e equilíbrio diferiu do atual, bem como a taxa de descongelação do sêmen, o que pode ter causado essa diferença nos resultados de motilidade espermática. Já JEDRZEJCZAK et al. (1996) utilizaram vários meios diluidores que continham concentrações diferentes de Tes-Tris, porém a espécie testada foi a humana, o que pode justificar a diferença nos resultados obtidos.

Entre os dois meios diluidores testados, o Tris-citrato foi superior ao Tes-Tris, após a descongelação. A presença de frutose no meio Tris-citrato pode ter sido o fator diferencial entre os dois meios diluidores. Como citado por FOOTE (1964) e FOOTE e LEONARD (1964), os espermatozóides da espécie

canina tem seu período de sobrevivência aumentado, quando no meio diluidor há uma fonte exógena de energia.

Segundo BARTLLET (1962), os espermatozóides na espécie canina são capazes de utilizar eficientemente a frutose como fonte de energia, a despeito de possuí-la em baixas concentrações no plasma seminal. Assim, aparentemente, a frutose presente no meio Tris-citrato, foi transformada em energia pelos espermatozóides, por processos metabólicos da célula, mantendo a movimentação da região da cauda espermática por mais tempo, que é o que se avalia nos parâmetros de motilidade e vigor espermáticos.

Quanto à integridade da membrana plasmática dos espermatozóides, não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos após a diluição e o resfriamento do sêmen. No entanto, houve diferença entre meios diluidores ($P<0,05$), após a congelação/descongelação do sêmen, sendo que o diluidor Tris-citrato apresentou resultado superior no teste hipo-osmótico (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores percentuais médios (X) e coeficiente de variação (CV) do teste hipo-osmótico (HOS-T) em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a criopreservação com diferentes diluidores

	Sêmen fresco			Diluidor	Sêmen diluído			Sêmen resfriado			Sêmen congelado		
	X	CV	D		X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D
HOS-T	94,5	3%	3,01	Tris-citrato	93,3a	3%	3,25	88,5a	5%	4,98	55,1a	21%	12,0
				Tes-Tris	90,8a	4%	3,93	84,8a	6%	5,74	40,8b	18%	7,72

As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($P<0,05$), pelo teste de Tukey

Os resultados do HOS-T demonstram claramente que os espermatozóides já sofreram algum tipo de alteração de membrana plasmática, durante o resfriamento, pois o número de espermatozóides apresentando cauda enrolada decresceu cerca de 8% dos valores iniciais, para ambos os diluidores. KUMI-DIAKA e BADTRAM (1994) e ROTA et al. (1995), encontraram valores semelhantes para o sêmen resfriado, sendo esses de 86,7 e 91% de espermatozóides com cauda enrolada, respectivamente.

Verifica-se pelos dados apresentados, que a criopreservação implica em um processo estressante à célula espermática, devido a queda dos valores do HOS-T para o sêmen congelado de mais de 40% dos valores iniciais.

Os valores do HOS-T para o sêmen congelado são condizentes com os valores encontrados na literatura, sendo esses em torno de 40 a 60% de espermatozóides com cauda enrolada, considerando-se as espécies humana (MC LAUGHLIN et al., 1992), canina (KUMI-DIAKA, 1993; ENGLAND e PONZIO, 1996) eqüina (ESTEVES et al., 1996; NEILD et al., 1999) e caprina (PÉREZ et al., 1997; SODERQUIST et al., 1997).

O HOS-T 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). Portanto, naquelas células que já sofreram alguma alteração de membrana, pode-se esperar que a resposta ao HOS-T não seja tão evidente, ou seja, a membrana plasmática vai responder à solução hipo-osmótica de modo diferenciado.

Essa resposta diferenciada ao HOS-T foi relatada por diversos autores (JEYENDRAN et al., 1984; ZAVOS, 1991; JEYENDRAN et al., 1992; ENGLAND e PONZIO, 1993; KUMI-DIAKA, 1993; RODRIGUEZ-GIL et al., 1994; HOSSAIN et al., 1998; NEILD et al., 1999) e pôde ser confirmada no presente experimento, onde se observou uma igual amplitude de resposta ao teste hipo-osmótico.

Nas amostras de sêmen fresco e diluído submetidas ao HOS-T, dos espermatozóides reativos ao teste, cerca de 100% estavam com a cauda

fortemente enrolada. Após o resfriamento, houve um decréscimo na porcentagem de espermatozóides que apresentavam a cauda fortemente enrolada e concomitantemente, o aparecimento de várias fases de enrolamento de cauda, fases essas descritas anteriormente por JEYENDRAN et al. (1984) para o sêmen humano e por KUMI-DIAKA (1993) para o sêmen canino.

Após a congelação, tornou-se ainda mais evidente a presença de fases distintas de cauda enrolada. A maioria dos espermatozóides que reagiram ao teste, apresentavam somente a região intermediária da cauda enrolada ou, até mesmo, somente a região final. Esses resultados corroboram os de KUMI-DIAKA (1993), para o HOS-T com o sêmen congelado. Parece que, mesmo aqueles espermatozóides que, após a criopreservação, estão aptos a responder ao HOS-T, apresentam algum comprometimento da membrana plasmática, o que seria responsável por uma resposta menos evidente ao teste.

Entre os dois diluidores (Tes-Tris e Tris-citrato) houve diferença ($P < 0,05$) após a congelação/descongelação do sêmen no resultado do HOS-T, sendo que o valor mais alto foi com o meio Tris-citrato. No meio diluidor, os componentes que conferem proteção e estabilidade à membrana plasmática dos espermatozóides, submetidos à criopreservação, são os fosfolipídeos da gema de ovo (QUINN et al., 1980; WATSON, 1981) e o crioprotetor (ALLER et al. 1995). Entretanto, entre os meios diluidores utilizados, a concentração de gema de ovo e glicerol foram idênticas, assim, possivelmente outro fator tenha atuado, como uma possível interação entre os componentes.

A avaliação da condição do acrossoma dos espermatozóides revelou que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos após as etapas de diluição e resfriamento do sêmen, porém, houve diferença na integridade do acrossoma dos espermatozóides ($P < 0,05$) entre os tratamentos, após a congelação/descongelação do sêmen, sendo que o diluidor Tris-citrato apresentou valores mais elevados de acrossomas íntegros que o Tes-Tris (Tabela 5).

Segundo CROSS e MEIZEL (1989), as membranas acrossomais podem sofrer lesões durante o processamento do sêmen, o que foi observado a partir da

Tabela 5 - Valores percentuais médios (X) e coeficiente de variação (CV) de acrossomas espermáticos íntegros em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a criopreservação com diferentes diluidores

	Sêmen fresco			Diluidor	Sêmen diluído			Sêmen resfriado			Sêmen congelado		
	X	CV	D		X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D
Condição de Acrossoma	96,7	1%	1,57	Tris-citrato	95,8a	4%	4,24	88,1a	8%	7,33	66,7a	16%	11,26
				Tes-Tris	95,0a	4%	4,43	83,1a	8%	6,83	58,3b	16%	9,81

As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($P<0,05$), pelo teste de Tukey.

etapa do resfriamento, quando a porcentagem de acrossomas íntegros decresceu em cerca de 10%, se comparada às porcentagens obtidas no sêmen fresco ou diluído. Parece que os espermatozóides, por terem sido submetidos a uma diminuição de temperatura, podem ter sofrido alterações de acrossoma, devido a ocorrência de choque térmico, que de modo geral afeta todas as membranas espermáticas, inclusive a acrossomal (WATSON, 1995).

Adicionalmente, OETTLÉ (1986) ressaltou que uma quantidade considerável de espermatozóides sofre lesões, durante o resfriamento e equilíbrio do sêmen. Por isso, torna-se importante a otimização do processamento inicial do sêmen, pois está claro que, quanto mais alta a porcentagem de espermatozóides com acrossomas íntegros, antes da congelação, maior a população espermática viável e com potencial de sobrevivência após o processamento

Entre os meios diluidores, o Tris-citrato apresentou resultados superiores ($P<0,05$) (Tabela 5), quanto à manutenção da integridade de acrossoma após a congelação, talvez pela melhor preservação das membranas espermáticas, o que já havia sido notado no HOS-T.

Os resultados observados na Tabela 5, sobre a condição do acrossoma dos espermatozóides, para o sêmen resfriado, são superiores aos relatados por

OETTLÉ (1986) de 65% de acrossomas íntegros e semelhantes aos relatados por ROTA et al. (1995) de 85% de acrossomas íntegros. Sendo que em ambos os experimentos citados, o diluidor utilizado foi o Tris-gema de ovo, porém, OETTLÉ (1986) não especifica a metodologia utilizada para o resfriamento, o que pode ter induzido a maiores alterações de acrossoma e além disso, os métodos de análise do acrossoma utilizados foram diferenciados.

A maioria das lesões observadas nos acrossomas após o resfriamento foi de edema, com moderada manifestação. Logo após a descongelação do sêmen, as lesões de acrossoma observadas foram numerosas, sendo que houve um decréscimo de acrossomas íntegros de cerca de 30 a 40%, com relação aos valores iniciais encontrados para o sêmen fresco e diluído. A maioria das lesões de acrossomas, induzidas pela criopreservação, foram mais graves e intensas que as lesões produzidas pelo resfriamento, podendo-se observar edemaciamento severo, desprendimento e até perda total de acrossoma em parte dos espermatozóides. OETTLÉ (1986) e STROM et al. (1997) relataram que durante o processamento do sêmen, a criopreservação é responsável pelo aparecimento de lesões mais graves nos acrossomas.

Mesmo havendo muitas alterações de acrossoma após a criopreservação, os valores apresentados estão bastante próximos dos encontrados por OETTLÉ, (1986), ENGLAND e PONZIO (1996), STROM et al. (1997), PEÑA et al. (1998a), PEÑA et al. (1998b) e ROTA (1998) e foram superiores aos obtidos por IVANOVA-KICHEVA et al. (1995) e HAY et al. (1997). Sendo que, no experimento conduzido por HAY et al. (1997) foram utilizadas cinco taxas diferentes de congelação, desde taxas lentas até muito rápidas, que podem ter causado maiores danos de acrossoma e ser responsável por esse resultado inferior. Ainda, IVANOVA-KICHEVA et al. (1995) congelaram o sêmen em *pellets*, o que pode ter sido responsável por essas diferenças nos resultados.

Não houve diferença ($P>0,05$) durante o teste de termo-resistência (TTR) entre os dois diluidores nas etapas de diluição e resfriamento do sêmen, quanto a longevidade dos espermatozóides, quando se compararam os resultados de motilidade e vigor aos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos do teste, porém, para o sêmen

congelado, observou-se que houve diferença entre os meios diluidores, durante todo o TTR ($P < 0,05$), sendo que os maiores valores foram nas amostras de sêmen com o diluidor Tris-citrato (Tabelas 6 e 7; Figura 1).

Os resultados do teste de termo-resistência evidenciaram que houve uma queda gradual dos parâmetros de motilidade e vigor, ao longo de duas horas de duração do teste, para qualquer uma das etapas (diluição, resfriamento e congelamento) de processamento do sêmen. No entanto, essa queda foi mais acentuada nas amostras de sêmen resfriado e congelado, demonstrando que os espermatozóides, após serem submetidos a mudanças de temperatura, têm menor longevidade ao longo do teste.

Apesar de ter sido verificado variação individual entre machos em outras espécies domésticas, quanto a resistência do sêmen ao resfriamento e à congelamento, poucos estudos abordaram esse fato na espécie canina. Entretanto, DAVIES (1982) citado por ENGLAND (1993) observou que um empecilho para a utilização de sêmen criopreservado nessa espécie, seria uma evidente variação individual, entre os cães, quanto a sobrevivência do espermatozóide, após a descongelamento do sêmen.

Pôde-se verificar um aumento no coeficiente de variação após o resfriamento e a congelamento do sêmen, nos parâmetros de motilidade e vigor espermáticos durante o TTR (Tabelas 6 e 7), o que pode ser explicado pelo fato de ter havido variações quanto a congelabilidade do sêmen entre os machos utilizados, ou seja, existiram animais que apresentaram uma menor resistência do sêmen durante o TTR do que outros, semelhante ao relatado por DAVIES (1982) citado por ENGLAND (1993).

A diferença quanto a resistência do sêmen entre os animais foi evidenciada durante o TTR nos momentos de 30, 60, 90 e 120 minutos do teste, quando o coeficiente de variação foi bastante elevado, porém, imediatamente após o resfriamento e a congelamento, o coeficiente de variação foi baixo. Assim, a análise do sêmen somente após o seu processamento, sem observações subseqüentes, não evidenciaria essa diferença entre os cães quanto à resistência do sêmen, salientando-se assim, a importância da realização do teste.

Tabela 6 - Valores médios (X) percentuais e coeficiente de variação (CV) de motilidade espermática progressiva obtidos durante o TTR, nas amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas à criopreservação com diferentes diluidores

Etapas	Diluidor	TTR (Minutos)														
		0			30			60			90			120		
		X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D
Fresco		94	2%	2,2	86	4%	3,4	78	8%	6,8	71	16%	11,5	63	23%	14,6
Diluído	Tes-Tris	92a	2%	2,5	83a	4%	3,6	74a	6%	4,9	65a	10%	6,6	56	17%	9,7
	Tris-citrato	90a	3%	2,5	82a	7%	6,3	74a	8%	6,1	59a	23%	13,7	49a	34%	16,7
Resfriado	Tes-Tris	82a	2%	2,4	60a	20%	12,3	38a	50%	19,1	22a	90%	19,8	15a	121%	18,2
	Tris-citrato	82	3%	3,1	63	34%	21,5	45a	48%	21,9	27a	69%	18,7	17a	67%	11,4
Congelado	Tes-Tris	38a	25%	9,6	20a	50%	10,1	12a	86%	10,4	6a	140%	8,4	4a	190%	7,6
	Tris-citrato	63b	11%	7,1	33b	40%	13,2	22b	57%	12,6	16b	68%	10,9	12	122%	14,7

As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna e por etapas, diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Tabela 7 - Valores médios de vigor obtidos durante o TTR, nas amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes diluidores e avaliadas durante as etapas da criopreservação

Etapas	Diluidor	TTR (Minutos)														
		0			30			60			90			120		
		X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D
Fresco		4	15%	0,6	4	12%	0,5	3	16%	0,5	3	16%	0,5	3	20%	0,6
Diluído	Tes-Tris	4a	12%	0,5	4a	12%	0,5	3a	16%	0,5	3a	20%	0,6	3a	20%	0,6
	Tris-citrato	4a	15%	0,6	3a	12%	0,5	3a	0,5%	0,5	3a	20%	0,6	3a	20%	0,6
Resfriado	Tes-Tris	4a	10%	0,4	3a	13%	0,4	2a	20%	0,4	1a	40%	0,4	1a	40%	0,4
	Tris-citrato	4a	10%	0,4	3a	13%	0,4	2a	20%	0,4	1a	40%	0,4	1a	60%	0,6
Congelado	Tes-Tris	2a	25%	0,5	1a	60%	0,6	1a	80%	0,8	0,5a	0,5%	0,8	0,5a	140%	0,7
	Tris-citrato	3b	16%	0,5	2b	35%	0,7	2b	45%	0,9	1b	80%	0,8	1b	80%	0,8

As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna e por etapas, diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

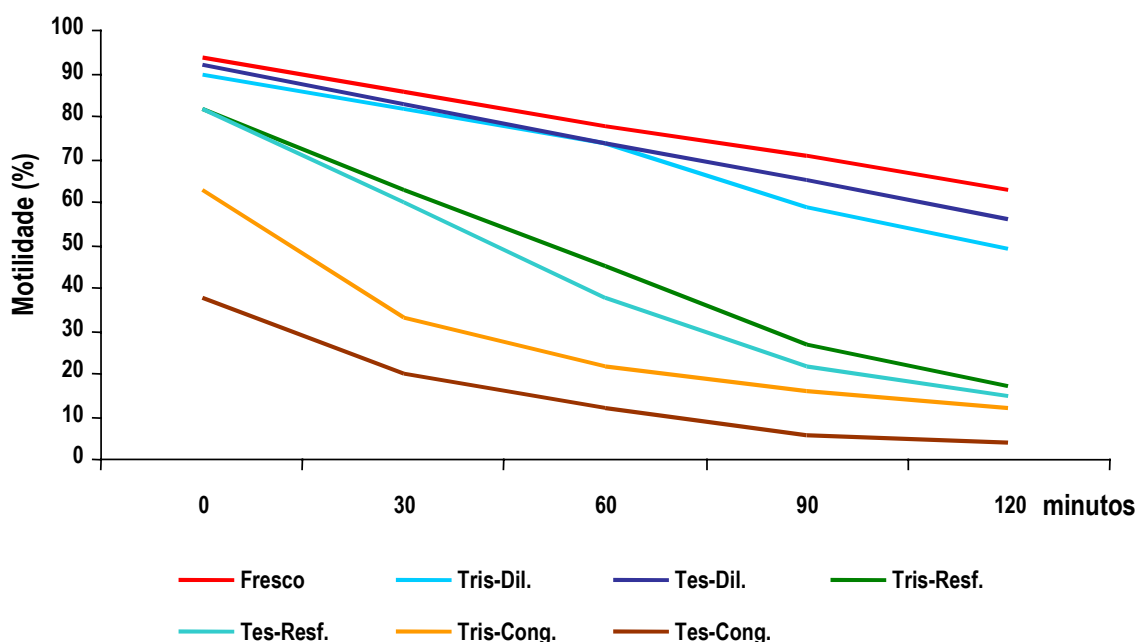


Figura 1 - Curvas da motilidade espermática progressiva (%) durante o TTR de amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes diluidores para a criopreservação.

O resultado do TTR do sêmen criopreservado foi inferior ao encontrado por THOMAS et al. (1992) e HAY et al. (1997), que relataram motilidade espermática entre 30 a 50%, após duas horas de incubação do sêmen diluído em meio Tris-citrato-gema de ovo. Porém, faz-se necessário ressaltar que THOMAS et al. (1992) mantiveram as amostras de sêmen a temperatura de 22°C e HAY et al. (1997) mantiveram a 0°C, durante todo o período de observação do sêmen, o que pode ter influenciado, sobremaneira, na diferença entre os resultados apresentados na Tabela 6 e os relatados por esses autores.

No entanto, os valores do TTR encontrados por ROTA et al. (1997), PEÑA et al. (1998a) e PEÑA et al. (1998b), que relataram motilidade espermática de cerca de 15%, após duas horas de incubação do sêmen a 38°C, em amostras que foram diluídas em meio Tris-citrato-gema de ovo foram semelhantes aos observados no presente experimento.

Poucos são os estudos que relatam resultados de testes *in vitro* com o meio Tes-Tris na espécie canina. England (1992) citado por ROTA et al. (1998) utilizou esse meio para a congelação do sêmen canino e relatou que, após três horas de incubação do sêmen, a motilidade espermática havia decrescido cerca de 75% dos valores iniciais.

Após a congelação do sêmen, o meio Tris-citrato apresentou melhores resultados ($P < 0,05$) no TTR que o meio Tes-Tris, quanto à motilidade e ao vigor espermáticos, mantendo a viabilidade da célula espermática por maior período de tempo (Tabelas 6 e 7; Figura 1). Acredita-se que um dos fatores que contribuiu para esse resultado seja o fato de somente o diluidor Tris possuir frutose como um de seus componentes, o que funciona como reserva energética para os espermatozóides (BARTLLET, 1962; FOOTE, 1964; FOOTE e LEONARD, 1964). Aparentemente, os espermatozóides diluídos no meio Tris-citrato, por possuírem uma maior reserva energética, apresentaram maior longevidade.

Além disso, o diluidor Tris-citrato apresentou resultados superiores com relação ao diluidor Tes-Tris em outros testes (HOS-T e condição de acrossoma) que avaliam a viabilidade das membranas espermáticas. Isso demonstra uma superioridade desse diluidor em conferir melhor proteção ao espermatozóide, quando comparado ao Tes-Tris. Parece claro, que os espermatozóides que estão mais bem protegidos por um meio diluidor terão maior longevidade.

Mesmo havendo resultados semelhantes na literatura, os valores encontrados para motilidade e vigor espermáticos, durante o TTR, foram baixos. Segundo ROTA et al. (1999), um dos fatores que limita a fertilidade do sêmen criopreservado, na espécie canina, é o curto período de sobrevivência dos espermatozóides, após a descongelação. Essa limitada sobrevivência, pode ser reflexo de lesões latentes causadas pela congelação e descongelação, como alterações da organização da membrana plasmática ou função mitocondrial ou danos a outras organelas.

No entanto, esses mesmos autores utilizaram sêmen para IA em cadelas que havia sido testado em TTR e obtido 17% de motilidade espermática, após duas horas de teste. A taxa de prenhez alcançada foi de 84%, considerada alta

para a espécie. Acredita-se, portanto, que em condições *in vivo*, mesmo os espermatozóides que apresentam baixa motilidade, possam interagir no trato reprodutor feminino com fatores que influenciem, positivamente, sua longevidade.

Pelos resultados dos testes, observou-se que o meio diluidor Tris-citrato é superior ao meio Tes-Tris para a criopreservação de sêmen canino, nessas condições experimentais. Pois em todos os testes sobre a qualidade espermática, após a congelação, as amostras de sêmen submetidas ao meio Tris-citrato obtiveram médias significativamente maiores que as amostras submetidas ao meio Tes-Tris.

Os dois meios testados diferiram em suas formulações, principalmente, quanto à presença de uma fonte exógena de energia (açúcares), sendo que o meio Tris-citrato é o único que a possuía, na sua formulação, por possuir frutose e foi o diluidor que apresentou os melhores resultados. OLAR et al. (1989) testaram dois meios diluidores e encontraram que a motilidade espermática foi superior com o meio Tris, contendo glicose, quando comparado ao meio à base de lactose. Segundo Mann (1964) citado por ENGLAND (1993), o espermatozóide canino é capaz de glicolisar glicose, frutose e manose para obtenção de energia. Parece, portanto, que a presença de um desses componentes é essencial para a sobrevivência do espermatozóide criopreservado.

Os meios diluidores diferiram também em sua composição, quanto aos componentes tampões. No meio Tris os componentes tris e citrato realizaram o tamponamento e no meio Tes os tampões foram o tes e o tris, presentes na sua formulação. Segundo FOOTE e LEONARD (1964), o citrato é um eficiente tampão para o sêmen canino. Já Watson (1990) citado por ENGLAND (1993), verificou que os tampões da classe dos íons dipolares, à qual pertence o tris e o tes, são pouco eficientes em pH neutro. Assim, no meio Tris-citrato, os dois componentes tampões de classes diferentes, podem ter sido mais eficientes em manter o pH das amostras de sêmen próximo da neutralidade, o que pode ter favorecido a sobrevivência de uma maior porcentagem de espermatozóides, após a criopreservação.

Houve correlação positiva entre a motilidade e o vigor espermáticos com o TTR (Tabela 8), para ambos protocolos. Pode-se dizer, portanto, que os resultados de motilidade e vigor espermáticos das amostras de sêmen, imediatamente após a descongelação, tiveram um reflexo positivo sobre o TTR. Assim, as partidas de sêmen que apresentaram maior motilidade após a descongelação, foram as mesmas que obtiveram maior longevidade durante o teste.

Tabela 8 - Correlações de Pearson entre a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático, imediatamente após a descongelação com o TTR do sêmen congelado/descongelado

Parâmetros	r*
mTTR ₃₀ vs Cmot	0,63
mTTR ₆₀ vs Cmot	0,48
mTTR ₉₀ vs Cmot	0,51
mTTR ₁₂₀ vs Cmot	0,49
vTTR ₃₀ vs Cvig	0,59
vTTR ₆₀ vs Cvig	0,50
vTTR ₉₀ vs Cvig	0,45
vTTR ₁₂₀ vs Cvig	0,46

*significativo ($P < 0,05$); mTTR_{30, 60, 90 e 120} – motilidade espermática no TTR aos 30, 60, 90 e 120 minutos do teste; vTTR_{30, 60, 90 e 120} - Vigor espermático no TTR aos 30, 60, 90 e 120 minutos do teste; Cmot – motilidade espermática do sêmen congelado; Cvig – Vigor espermático do sêmen congelado.

Observou-se, por meio dos dados apresentados na Tabela 9, que houve correlação positiva entre a motilidade e o vigor espermáticos, imediatamente após a descongelação com o HOS-T do sêmen congelado/descongelado; bem como entre a motilidade e o vigor com o HOS-T, após o resfriamento. Para que os espermatozóides sejam responsivos ao teste hipo-osmótico, a membrana plasmática da região da cauda precisa estar íntegra e funcional, para que, quando em contato com a solução hipo-osmótica, permita a entrada de água, até estabelecer um equilíbrio osmótico. Assim, esse teste avalia a funcionalidade da membrana plasmática (JEYENDRAN et al., 1984; JEYENDRAN et al., 1992). Por outro lado, a motilidade e o vigor espermáticos também são dependentes da condição da membrana plasmática dos espermatozóides, além de dependerem de alguns outros fatores. Por isso, a correlação positiva entre o HOS-T e a motilidade e o vigor espermáticos é bastante coerente (JEYENDRAN et al., 1984; KUMI-DIAKA, 1993).

No entanto, não houve correlação entre o teste hipo-osmótico realizado no sêmen fresco e diluído e a motilidade e vigor espermáticos, em qualquer das etapas do processamento do sêmen. JEYENDRAN et al. (1984) e JEYENDRAN et al. (1992) verificaram que a correlação entre a motilidade e o HOS-T é mais alta quando a porcentagem de espermatozóides com a cauda enrolada, for em torno de 50%, do que quando essa porcentagem é maior.

Admite-se que, em condições nas quais o HOS-T tiver resultados baixos, com menos espermatozóides reativos ao teste, como após a descongelação, a motilidade espermática, certamente, também estaria diminuída. Porém, em porcentagens altas do HOS-T, a motilidade pode estar normal ou diminuída; isso se deve ao fato de a motilidade espermática depender, não só da funcionalidade da membrana plasmática, avaliada no HOS-T, como também da viabilidade dos processos bioquímicos celulares (JEYENDRAN et al., 1984; JEYENDRAN et al., 1992).

As correlações (Tabela 9) estão bem próximas das citadas na literatura para sêmen de humanos (JEYENDRAN et al., 1984; VAN DER VEN et al.,

Tabela 9 - Correlações de Pearson entre a motilidade espermática progressiva, o vigor espermático e o TTR com o HOS-T do sêmen resfriado e congelado/descongelado

Parâmetros	r*
R HOS-T vs Rmot	0,34
C HOS-T vs Cmot	0,63
R HOS-T vs Rvig	0,42
C HOS-T vs Cvig	0,63
C HOS-T vs mTTR ₃₀	0,52
C HOS-T vs mTTR ₆₀	0,66
C HOS-T vs mTTR ₉₀	0,68
C HOS-T vs mTTR ₁₂₀	0,60
C HOS-T vs vTTR ₃₀	0,48
C HOS-T vs vTTR ₆₀	0,56
C HOS-T vs vTTR ₉₀	0,58
C HOS-T vs vTTR ₁₂₀	0,65

*significância ($P < 0,05$); R HOS-T = teste hipo-osmótico do sêmen resfriado; C HOS-T = teste hipo-osmótico do sêmen congelado; Rmot = motilidade espermática do sêmen resfriado; Cmot = motilidade espermática do sêmen congelado; Rvig = vigor espermático do sêmen resfriado; Cvig = vigor espermático do sêmen congelado; mTTR_{30, 60, 90 e 120} – motilidade espermática do TTR aos 30, 60, 90 e 120 minutos de teste; vTTR_{30, 60, 90 e 120} - vigor espermático do TTR aos 30, 60, 90 e 120 minutos de teste.

1986), caninos (KUMI-DIAKA, 1993; RODRIGUEZ-GIL et al., 1994; KUMI-DIAKA e BADTRAM, 1994), bovinos (PÉREZ et al., 1997) e eqüinos (NEILD et al., 1999). No entanto, ENGLAND e PLUMMER (1993) e IANAMASSU et al. (1999), analisando o HOS-T para o sêmen canino, não encontraram correlação entre os parâmetros citados.

Dentre os trabalhos citados, KUMI-DIAKA (1993), PÉREZ et al. (1997) e NEILD et al. (1999) encontraram correlações entre a motilidade e o HOS-T de amostras de sêmen congelado e resfriado, semelhante ao presente experimento. Pode-se observar, perante esses resultados que se uma amostra de sêmen estiver satisfatória quanto motilidade e vigor espermáticos, tanto após o resfriamento, quanto após a congelação, terá também um bom resultado no HOS-T, demonstrando funcionalidade de membrana plasmática.

Observou-se, por meio dos resultados apresentados na Tabela 9, que houve correlação positiva entre o HOS-T e o TTR, ambos para o sêmen congelado. Parece que os espermatozóides que mantiveram a funcionalidade de sua membrana plasmática, após a criopreservação, permaneceram viáveis por mais tempo. Além disso, durante o TTR, o parâmetro observado é a motilidade espermática e, como já discutido, o HOS-T e a motilidade avaliam, em parte, a mesma estrutura, que é a membrana plasmática.

Observou-se, por meio dos resultados apresentados na Tabela 10, que houve correlação positiva entre a motilidade aos 30, 60, 90 e 120 minutos no TTR do sêmen congelado e a avaliação da condição de acrossoma do sêmen resfriado e congelado. OETTLÉ (1986) relatou correlação entre a motilidade espermática e a condição de acrossoma, porém somente para o sêmen fresco e não para as amostras resfriadas e congeladas.

Observou-se, por meio dos dados apresentados na Tabela 10, correlação positiva entre o HOS-T do sêmen congelado com a avaliação da condição do acrossoma, em todas as etapas de análise do sêmen (fresco, diluído, resfriado e congelado). JEYENDRAN et al. (1984) observaram correlação alta e positiva entre a porcentagem de espermatozóides capacitados, que penetraram no ovócito

Tabela 10 - Correlações de Pearson entre a condição de acrossoma com o TTR e com o HOS-T do sêmen congelado/descongelado

Parâmetros	r*
R-Acro vs mTTR ₃₀	0,31
R-Acro vs mTTR ₆₀	0,52
R-Acro vs mTTR ₉₀	0,53
R-Acro vs mTTR ₁₂₀	0,46
C-Acro vs mTTR ₃₀	0,37
C-Acro vs mTTR ₆₀	0,50
C-Acro vs mTTR ₉₀	0,47
C-Acro vs mTTR ₁₂₀	0,41
I-Acro vs C HOS-T	0,35
D-Acro vs C HOS-T	0,42
R-Acro vs C HOS-T	0,55
C-Acro vs C HOS-T	0,61

*significativo ($P < 0,05$); I-Acro = integridade do acrossoma no sêmen fresco; D-Acro = integridade do acrossoma no sêmen diluído; R-Acro = integridade do acrossoma no sêmen resfriado; C-Acro = integridade do acrossoma no sêmen congelado; C HOS-T = teste hipo-osmótico do sêmen congelado; mTTR = motilidade espermática do TTR do sêmen congelado aos 30, 60, 90 e 120 minutos do teste

desnudo de hamster e a porcentagem de espermatozóides responsivos ao HOS-T. Com base nesse resultado, esses autores propuseram que o HOS-T estaria avaliando, indiretamente, a funcionalidade da membrana plasmática, da região da cabeça do espermatozóide. Mesmo que a membrana da região da cauda e da cabeça do espermatozóide sejam, estruturalmente, diferentes parece que o HOS-T estaria avaliando também a região da cabeça espermática, devido às altas correlações encontradas entre os testes citados.

No presente experimento, a correlação entre a análise da condição do acrossoma espermático, que analisa parte das estruturas da cabeça do espermatozóide com o HOS-T, pode indicar, também, que as regiões espermáticas (cabeça e cauda) não são totalmente independentes, quanto ao seu funcionamento e integridade.

As correlações positivas da condição do acrossoma em várias etapas de processamento do sêmen (Tabela 11) indicam que, quanto menor o número de lesões acrossomais que uma amostra de sêmen apresenta, em uma das etapas de processamento, menor será esse número na etapa subsequente. Assim, o sêmen que apresentou maior número de espermatozóides com acrossomas íntegros, após a coleta foi o que obteve o melhor resultado, quanto a esse parâmetro, após a criopreservação.

Verificou-se (Tabela 12) que houve correlação positiva entre o TTR do sêmen resfriado e do congelado, podendo-se inferir que, se uma amostra de sêmen tiver bons resultados, quanto sua longevidade, logo após o resfriamento do sêmen, essa amostra terá maior longevidade também, após a descongelação. Esse achado é importante para se estabelecer, previamente, se um sêmen terá boa congelabilidade ou não, já que um dos maiores entraves na congelação do sêmen canino é a baixa sobrevivência dos espermatozóides, após a criopreservação.

Tabela 11 - Correlações de Pearson entre a condição de acrossoma em diferentes etapas do processamento do sêmen

Parâmetros	r *
I-Acro vs D-Acro	0,63
I-Acro vs R-Acro	0,61
I-Acro vs C-Acro	0,52
D-Acro vs R-Acro	0,84
D-Acro vs C-Acro	0,35
R-Acro vs C-Acro	0,49

*significativo ($P < 0,05$); I-Acro = integridade do acrossoma no sêmen fresco; D-Acro = integridade do acrossoma no sêmen diluído; R-Acro = integridade do acrossoma no sêmen resfriado; C-Acro = integridade do acrossoma no sêmen congelado.

Tabela 12 - Correlações de Pearson entre o TTR realizado no sêmen resfriado e congelado/descongelado

Parâmetros	r*
vR ₃₀ vs vC ₃₀	0,36
vR ₆₀ vs vC ₆₀	0,33
vR ₉₀ vs vC ₉₀	0,72
vR ₁₂₀ vs vC ₁₂₀	0,59
mR ₃₀ vs mC ₃₀	0,28
mR ₆₀ vs mC ₆₀	0,66
mR ₉₀ vs mC ₉₀	0,63
mR ₁₂₀ vs mC ₁₂₀	0,66

*significativo ($P < 0,05$); vR_{30, 60, 90 e 120} = vigor espermático no TTR do sêmen resfriado aos 30, 60, 90 e 120 minutos do teste; mR_{30, 60, 90 e 120} = motilidade espermática no TTR do sêmen resfriado aos 30, 60, 90 e 120 minutos do teste; vC_{30, 60, 90 e 120} = vigor espermático no TTR do sêmen congelado aos 30, 60, 90 e 120 minutos do teste; mC_{30, 60, 90 e 120} = motilidade espermática no TTR do sêmen congelado aos 30, 60, 90 e 120 minutos do teste.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A utilização de meios diluidores para criopreservação de sêmen é essencial para a manutenção da qualidade espermática. Os meios Tris-citrato e Tes-Tris foram utilizados com intuito de testar sua eficácia na congelação do sêmen canino. Para tal, foram realizados testes *in vitro* que avaliaram a qualidade espermática.

Os testes empregados nas avaliações das amostras seminais foram de motilidade e vigor espermáticos, avaliação da integridade de membrana e do acrossoma, por meio de teste hipo-osmótico e de observação do acrossoma em câmara úmida, respectivamente e longevidade espermática, por meio do teste de termo-resistência.

As análises realizadas demonstraram que não houve diferença de resultados entre os diluidores após a diluição e os períodos de resfriamento e equilíbrio do sêmen, sendo que os resultados obtidos nos testes, para o sêmen diluído e resfriado, foram satisfatórios. Porém, logo após a descongelação do sêmen houve diferença entre os diluidores, sendo que o meio Tris-citrato obteve os melhores resultados, em todos os testes realizados.

Desse modo, mediante aos resultados dos testes *in vitro* realizados no sêmen, concluiu-se que o meio diluidor Tris-citrato foi mais eficiente em preservar a qualidade da célula espermática que o meio Tes-Tris. Além disso, os

valores encontrados nos testes do sêmen congelado/descongelado com o meio Tris-citrato foram bastante satisfatórios.

CAPÍTULO 2

QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN CANINO CRIOPRESERVADO. II - UTILIZAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS DE RESFRIAMENTO

1. INTRODUÇÃO

Segundo WATSON (1995), os maiores estresses da criopreservação estão relacionados com as mudanças de temperatura, que são traduzidas como choque térmico e também com a formação e a dissolução de gelo durante a congelação e a descongelação, respectivamente. Ainda, HAMMERSTEDT et al. (1990) afirmaram que a mudança de temperatura durante o resfriamento do sêmen, sabidamente, altera as propriedades físicas das membranas espermáticas e conseqüentemente, a função celular. O choque térmico, que se refere a uma sensibilidade peculiar dos espermatozóides ao resfriamento repentino e rápido, é mais pronunciado quando o resfriamento é realizado rapidamente, na faixa de temperatura entre 20 a 0°C, e a severidade do efeito é dependente da taxa de

resfriamento e do intervalo de temperatura, sendo mais evidente na faixa de 12 a 2°C (WATSON, 1995).

QUINN et al. (1980) confirmaram que os espermatozóides de muitos animais, sofrem mudanças irreversíveis, quando resfriados muito rapidamente, entre 15 a 0°C. Ocorre uma falência da célula, que se torna incapaz de realizar suas atividades metabólicas e de movimentar-se, pelo fato de o choque ter causado ruptura das membranas celulares e perda dos constituintes intracelulares. O mecanismo preciso que causa a lesão primária não está bem compreendido, mas existem evidências de que a perda da propriedade de permeabilidade da membrana é um evento precoce nesse processo.

A susceptibilidade da membrana plasmática dos espermatozóides ao choque térmico difere entre as espécies e é dependente da taxa de ácidos graxos polinsaturados:saturados dos fosfolipídeos da membrana; quanto mais alta essa taxa, mais sensíveis são os espermatozóides ao choque térmico. A membrana plasmática do espermatozóide canino possui mais ácidos graxos saturados que em outras espécies animais, o que pode responder ao fato dos espermatozóides do cão serem menos susceptíveis ao choque térmico (DARIN-BENNETT et al., 1974).

Segundo JASKO (1994), se o resfriamento for realizado rapidamente, várias alterações podem ser verificadas, como diminuição na motilidade espermática e mudanças irreversíveis de membrana plasmática e acrossômica. Parece que se os períodos de resfriamento e equilíbrio forem controlados, os espermatozóides, ao invés de sofrerem choque térmico sofrem modificações graduais na membrana plasmática e de fluxos iônicos, que confeririam à célula uma maior resistência durante a congelação (ENGLAND, 1993; WATSON, 1995).

Adicionalmente, durante o resfriamento e equilíbrio controlados, os fosfolipídeos da gema de ovo (componente do diluidor), interagem com os lipídeos da membrana plasmática dos espermatozóides o que confere à célula maior resistência ao choque térmico e auxilia a preservar a integridade celular,

durante a preservação do sêmen (QUINN, et al., 1980; BOUCHARD et al., 1990; WATSON, 1995).

OLAR et al. (1989) utilizaram três períodos de resfriamento (uma, duas e três horas), reduzindo a temperatura de 37 para 5°C. Posteriormente, o sêmen foi colocado em equilíbrio por uma ou duas horas a 5°C, já envasado em palhetas de 0,5 mL. Observou-se que o tempo de resfriamento ou de equilíbrio influenciou a motilidade espermática somente após a congelação/descongelação do sêmen, sendo essa menor nas amostras que foram submetidas ao tempo de resfriamento de 2 horas e de equilíbrio de 2 horas.

DOBRINSKI et al. (1993), congelando sêmen de cão, relataram que, para o resfriamento, o sêmen foi colocado em recipientes térmicos, com água a 37°C e então submetido ao resfriamento por 50 minutos, a -0,5°C/minuto, até atingir 12°C e então resfriado por mais 15 minutos, a -0,6°C/minuto, até atingir 3°C, sem estar incubado. O período de equilíbrio expendeu 30 minutos a 3°C.

Para o resfriamento, o sêmen pode ser colocado em geladeira convencional, acondicionado em um recipiente fechado e mantido incubado à temperatura de 37°C, para que a queda de temperatura seja gradual (LINDE-FORSBERG, 1991). Outra forma de resfriamento do sêmen é através do uso de um recipiente com gelo, porém, sem o contato direto dos cubos gelo com o recipiente com o sêmen (LINDE-FORSBERG, 1991; HAY et al., 1997).

Poucos foram os experimentos sobre criopreservação do sêmen canino que relataram o procedimento utilizado para o resfriamento, sendo que a maioria deles, se limita a descrever somente o tempo de resfriamento e equilíbrio e as temperaturas inicial e final aplicadas (THOMAS et al., 1993; IVANOVA-KICHEVA et al., 1995; SILVA e VERSTEGEN, 1995; ENGLAND e PONZIO, 1996; ROTA et al., 1997; ROTA et al., 1999).

O objetivo desse estudo foi de avaliar o efeito de dois procedimentos de resfriamento do sêmen, sobre a qualidade espermática do sêmen canino criopreservado, por meio de análises *in vitro* do sêmen e, ao mesmo tempo, viabilizar um método prático e não oneroso de resfriamento de sêmen.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados três cães, clinicamente sadios, com idade de dois, três e seis anos, da raça Labrador do Retriever. Os animais foram mantidos, durante todo procedimento experimental, sob condições normais de manejo alimentar.

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 (CBRA, 1998; FELDMAN e NELSON, 1996).

A coleta de sêmen foi realizada em intervalos semanais, pelo método de manipulação digital. O número de coletas por macho foi de cinco, totalizando quinze coletas, para o procedimento experimental. As coletas foram realizadas em ambiente apropriado e sempre o mesmo local. Os materiais utilizados foram tubos de centrífuga de plástico graduados, acoplados a funil de plástico, sendo ambos acondicionados dentro de um recipiente de isopor, contendo água a 37°C e mantidos nesse recipiente durante a coleta. Assim, o sêmen permaneceu em temperatura controlada e sem contato direto com a luz.

As frações do ejaculado coletadas foram a primeira e a segunda (fração espermática), sendo que, imediatamente após o término da ejaculação da segunda fração, o tubo de centrífuga foi colocado em incubação a 37°C, em banho-maria

digital¹, com agitador automático. A terceira fração foi coletada em outro recipiente, até o término completo da ejaculação.

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

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

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

Após a avaliação, o sêmen foi diluído no meio Tris-citrato (ROTA et al., 1995), acrescido de 1 mg/mL de estreptomicina e 4% de glicerol. O sêmen recebeu pré-diluição, na proporção de um volume de sêmen para um volume de diluidor. Após a pré-diluição, foram retirados amostras de sêmen para os testes *in vitro* e o sêmen foi centrifugado por seis minutos a 700g, para retirada do líquido seminal e padronização das amostras.

¹ Tecnal.

² Olympus CBA.

Após a centrifugação e retirada do líquido sobrenadante, a amostra de sêmen foi rediluída e o volume acrescentado do diluidor foi suficiente, para o ajuste da concentração total de espermatozóides de 100 milhões por mL.

O sêmen foi envasado imediatamente após a rediluição, em palhetas de acetato de poliestileno de 0,5 mL, mantidas aquecidas e previamente identificadas, para ambos os procedimentos de resfriamento. Todo o processamento inicial do sêmen expendeu cerca de 30 minutos, até que o sêmen fosse submetido ao resfriamento.

O sêmen foi submetido a dois tratamentos de resfriamento e equilíbrio, sendo que para tal, as palhetas com sêmen envasado foram divididas na mesma quantidade, para os dois tratamentos descritos a seguir:

Primeiro Tratamento: metade das palhetas foi colocada em um frasco de vidro de 15 cm de altura e 5 cm de diâmetro, que estava pré-aquecido, sendo esse frasco, sistematicamente fechado, para evitar contato direto das palhetas com a água e então colocado dentro de um recipiente de plástico, que possuía 20 cm de altura e 12 cm de diâmetro. Esse recipiente continha 1250 mL de água a 37°C. Com esse procedimento, o frasco de vidro, contendo as palhetas, foi mantido incubado em água a 37°C, para o resfriamento.

Esses recipientes foram acondicionados dentro de uma caixa de isopor (Figura 1), na qual foi deixado um espaço para acoplar o recipiente de plástico, para que o mesmo permanecesse fixo dentro da caixa, medindo 32,5 cm de altura, 2,0 cm de espessura e 30,0 cm de largura. A caixa era previamente preparada com 8,0 litros de gelo e água, volume esse, pré-definido, para se atingir, de modo aproximado, a curva de resfriamento desejada.

A queda de temperatura da água que estava em contato com o frasco de vidro, onde estavam 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°C/min (Figura 2). Dessa forma, o resfriamento do sêmen ocorreu em cerca de 60 minutos, com temperatura inicial de 37°C, até atingir a temperatura final de

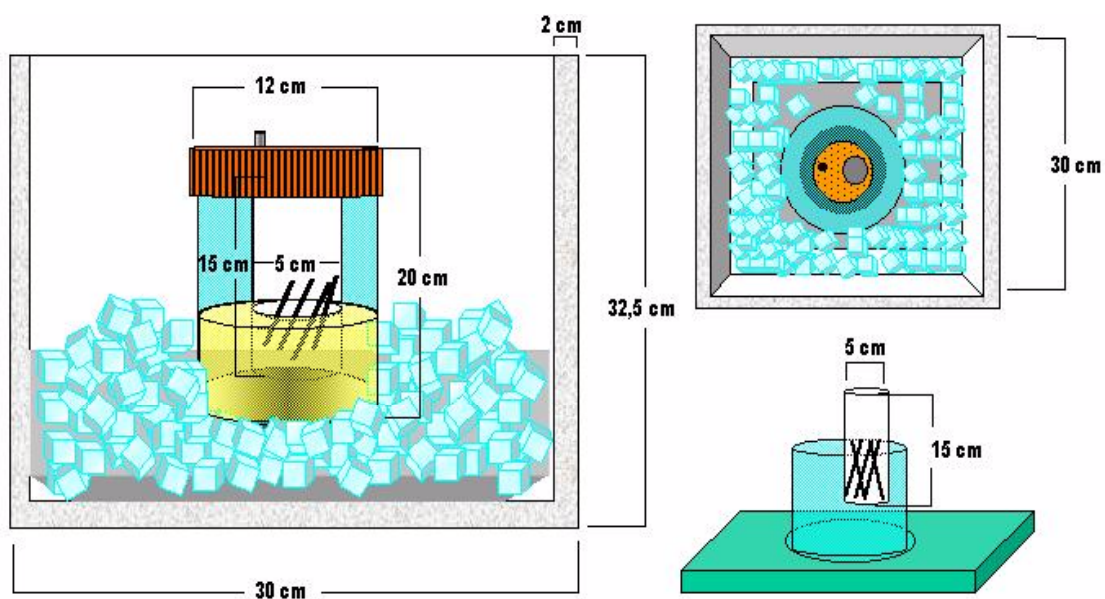


Figura 1 - Desenho esquemático da caixa de isopor utilizada para resfriar as amostras do sêmen, em um dos protocolos de resfriamento.

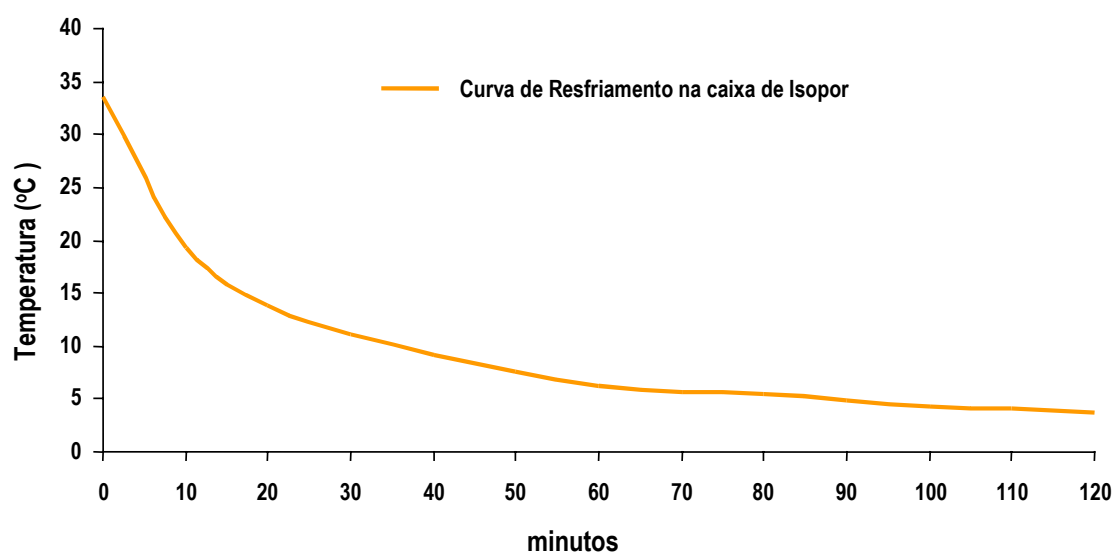


Figura 2 - Curva de resfriamento imposta ao sêmen resfriado na caixa de isopor, com gelo e água.

4°C, porém a queda de temperatura não foi constante, sendo que ela diminuiu mais rapidamente nos primeiros 10 minutos do resfriamento, até atingir 20°C (Figura 2) e a partir de então, foi mais lenta, alcançando cerca de 4°C, até o final desse período. As amostras permaneceram por 60 minutos, a aproximadamente 4°C, na mesma caixa de isopor (período de equilíbrio).

Segundo Tratamento: a outra metade das palhetas foi resfriada em um congelador de células digital (*biocool*), sendo submetida a uma curva exata de resfriamento de $-0,55^{\circ}\text{C}$ por minuto, por 60 minutos, iniciando a queda de temperatura em 37°C até atingir 4°C (Figura 3). O período de equilíbrio foi realizado a 4°C por 60 minutos, mantendo-se as palhetas no *biocool*.

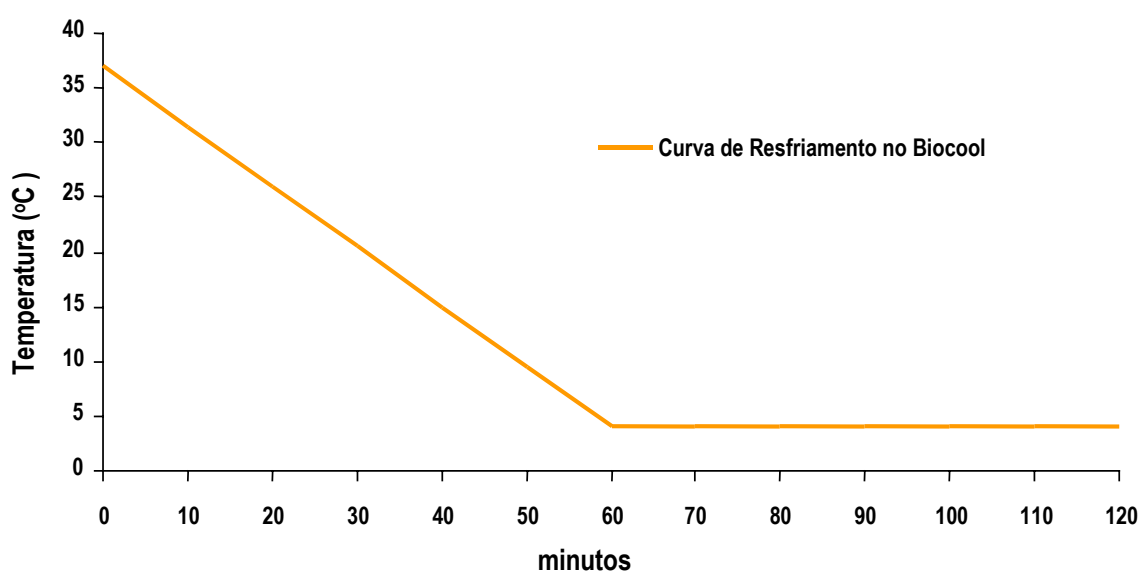


Figura 3 - Curva de resfriamento imposta ao sêmen resfriado no congelador de células (*biocool*).

A congelação foi realizada 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, que estava sobre o nitrogênio líquido, contido em uma caixa de isopor apropriada, de 32,5 cm de altura e contendo 15 cm de nitrogênio.

O sêmen foi pré-congelado, durante 15 minutos, no vapor de nitrogênio líquido e, após esse período, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio, para a congelação final do sêmen. A seguir, as palhetas foram acondicionadas em *canister* apropriado, para serem levadas aos botijões com nitrogênio líquido. O sêmen foi mantido criopreservado até o momento de sua utilização.

A descongelação do sêmen foi realizada em banho-maria a 75°C, por 6 segundos. Depois desse período, o sêmen foi retirado das palhetas e colocado em frascos *eppendorf* de 1,5 mL. Os frascos foram mantidos incubados a 37°C, até o momento das amostras serem avaliadas. A descongelação das amostras de sêmen foi feita entre uma semana, até, aproximadamente, um mês, após terem sido congeladas.

As amostras do sêmen, resfriadas em ambos os protocolos de resfriamento sob estudo, foram avaliadas após a coleta, a pré-diluição, o período de resfriamento e equilíbrio e a descongelação.

A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados segundo a metodologia descrita anteriormente.

A integridade da membrana plasmática foi avaliada em todas as etapas, por meio do teste hipo-osmótico (HOS-T), utilizando-se 0,1 mL de uma solução com frutose na concentração de 60 mosm/kg, acrescida de 0,1 mL de sêmen e incubada por 45 minutos, em banho-maria a 37 °C. Logo após, uma amostra da solução de 20 µL foi colocada em câmara de Neubauer e seguiu-se a contagem de 200 espermatozóides, em microscopia de contraste de fase, em aumento de 200x. As células foram classificadas quanto a presença ou não de cauda enrolada, sendo o resultado registrado em porcentagem (KUMI-DIAKA, 1993).

A integridade de acrossoma foi avaliada em amostras de sêmen retiradas e conservadas em solução de formol-salina tamponado (HANCOCK, 1957). A observação da integridade de acrossoma foi realizada em 200 espermatozóides,

em microscopia de contraste de fase³, em aumento de 1000x (MIES FILHO, 1982). Classificou-se os espermatozóides quanto ao acrossoma íntegro ou com algum tipo de alteração, que incluiu desde edema e desprendimento, até ausência de acrossoma. O resultado foi registrado em porcentagem de acrossomas íntegros.

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

As características estudadas foram submetidas ao teste de normalidade (Teste de LILLIEFORS) e homocedasticidade (Teste de COCHRAN e BARTLETT). Posteriormente, foram submetidas a Análise de Variância (ANOVA). As médias que apresentaram significância foram submetidas à comparação de médias, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico SAEG-UFV (EUCLYDES, 1982).

³ Olympus- BX 50.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se na Tabela 1 que as características seminais dos animais incluídos nesse experimento estavam condizentes com os parâmetros considerados normais para a espécie canina (SEAGER, 1986; JOHNSTON, 1991; LINDE-FORSBERG, 1991; FELDMAN e NELSON, 1996; CBRA, 1998). Considerou-se, portanto, que os cães estavam em condições de serem doadores de sêmen para a experimentação.

Observando-se a motilidade progressiva dos espermatozóides não foi encontrada diferença, logo após o resfriamento, para os dois protocolos utilizados ($P>0,05$). No entanto, após a descongelação, a motilidade espermática foi maior nas amostras de sêmen resfriadas na caixa de isopor ($P<0,05$), quando comparada com a motilidade das amostras de sêmen resfriadas no *biocool* (Tabela 2). Já com relação ao vigor espermático (Tabela 2) não houve diferença ($P>0,05$) entre os protocolos de resfriamento.

OLAR et al. (1989) relataram que os espermatozóides canino suportam uma certa variação nos períodos de resfriamento e equilíbrio, sem que essa variação tenha qualquer efeito prejudicial sobre a motilidade espermática, antes da criopreservação. Contudo, os mesmos autores notaram decréscimo na motilidade espermática, imediatamente após a descongelação, quando testaram

Tabela 1 - Características seminais de cães da raça Labrador do Retriever, doadores de sêmen para experimentação em criopreservação espermática

Características Seminais	Animais		
	Cão 01	Cão 02	Cão 03
Volume	4,6 ± 0,28 ml	4,0 ± 1,15 ml	2,0 ± 0,28 ml
Coloração	Marfim	Marfim	Marfim
Motilidade	90 ± 11,54%	90 ± 7,63%	85 ± 5,0%
Vigor	4 ± 0,28	4 ± 0,28	4 ± 0,5
Concentração	220.10 ⁶ ± 43,58 sptz/ml	210. 10 ⁶ ± 26,45 sptz/ml	250. 10 ⁶ ± 76,37 sptz/ml
Morfologia			
Defeitos Menores	6 ± 1,57%	14 ± 1,52%	9,5 ± 1,52%
Defeitos Maiores	7 ± 0,83%	4 ± 0,72%	8,0 ± 0,63%
Defeitos Totais	13 ± 1,23%	18 ± 1,08%	17,5 ± 1,03%

Tabela 2 - Valores médios e coeficiente de variação da motilidade (%) espermática progressiva e do vigor espermático em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes protocolos de resfriamento em caixa de isopor ou *biocool*

Etapas da Criopreservação	Isopor						<i>Biocool</i>					
	Motilidade			Vigor			Motilidade			Vigor		
	X	CV(%)	D	X	CV(%)	D	X	CV(%)	D	X	CV(%)	D
Sêmen Fresco	91,6	2,6	2,4	4	12	0,5	91,6	2,6	2,4	4	12	0,5
Sêmen Diluído	91,0	3,0	2,8	4	10	0,4	91,0	3,0	2,8	4	10	0,4
Sêmen Resfriado	79,0a	5,0	4,7	3a	13	0,4	78,0a	6,0	5,4	4a	12	0,5
Sêmen Congelado	65,6a	8,0	5,9	3a	13	0,4	56,0b	10,0	0,6	3a	13	0,4

As médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, diferem entre si (P<0,05), pelo teste de Tukey.

vários períodos de resfriamento e equilíbrio do sêmen; sendo esse decréscimo maior, nas amostras que foram submetidas ao tempo de resfriamento e de equilíbrio de 2 horas.

Entre o resfriamento realizado na caixa de isopor e no *biocool*, o que diferiu foi a curva de temperatura imposta às amostras de sêmen, já que os períodos de resfriamento e equilíbrio foram muito semelhantes, para ambos os protocolos. No resfriamento realizado na caixa de isopor (Figura 2), a queda de temperatura foi mais acentuada inicialmente, sendo que a temperatura decresceu cerca de 13°C em dez minutos, até alcançar 20°C, enquanto no *biocool* (Figura 3), a queda de temperatura foi gradual, sendo que, para alcançar os 20°C, decorreram 30 minutos.

A queda mais acentuada da temperatura até atingir 20°C, pode ter sido benéfica no sentido de diminuir, rapidamente, o metabolismo dos espermatozóides. Durante condições de baixa atividade metabólica, o que ocorre em temperaturas menores, as células mantêm suas reservas energéticas por mais tempo. Esse fato pode ter influenciado, positivamente, a motilidade espermática após a descongelação, nas amostras de sêmen que foram submetidas ao resfriamento na caixa de isopor, já que para manter a motilidade, o espermatozóide produz e despende muita energia (WATSON, 1995).

Por outro lado, poder-se-ia supor que a queda rápida de temperatura viesse a prejudicar a qualidade seminal, nas amostras de sêmen submetidas ao resfriamento na caixa de isopor, pois estaria causando choque térmico. Porém, segundo QUINN et al. (1980) e WATSON (1995), a temperatura crítica durante o resfriamento, que, não sendo controlada, induz ao choque térmico, está na faixa de 12 a 0°C. Nessa faixa de temperatura, o resfriamento do sêmen na caixa de isopor foi lento (Figura 2) e, por isso, não deve ter induzido ao choque térmico severo nos espermatozóides, como pôde ser observado nos resultados dos testes *in vitro*.

Com relação aos valores encontrados de motilidade espermática, BOUCHARD et al. (1990) relataram resultados semelhantes, sendo que

obtiveram 65% de motilidade, após o resfriamento, em amostras de sêmen que foram submetidas a uma taxa de resfriamento de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, até atingir 4°C .

Os valores de motilidade e vigor espermáticos encontrados (Tabela 2) estão semelhantes aos valores citados na literatura, tanto para o sêmen resfriado (ROTA et al., 1995), quanto para o sêmen congelado (THOMAS et al., 1993; STROM et al., 1997; ROTA et al., 1998). Nesses trabalhos, o meio diluidor utilizado também foi o Tris, com algumas modificações, no entanto, não foram descritas as curvas de resfriamento empregadas.

DOBRINSKI et al. (1993) relataram motilidade espermática, após a descongelação de cerca de 30%, em amostras de sêmen que foram resfriadas por 50 minutos a $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, até atingir 12°C e, então, resfriado por mais 15 minutos, a $-0,6^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, até atingir 3°C , sem estar incubado. O período de equilíbrio expendeu 30 minutos a 3°C . Apesar da similaridade nos protocolos de resfriamento, esse resultado foi bastante inferior ao encontrado no presente estudo, o que talvez possa ser explicado por terem utilizado diferentes diluidores (Triladyl, IMV-Universal, Pipes e Tris) e taxas de congelação lenta, intermediária e rápida para a criopreservação.

Não foi observada diferença ($P>0,05$) no teste hipo-osmótico entre os tratamentos, em qualquer uma das etapas do processamento do sêmen (Tabela 3). O HOS-T avalia a funcionalidade da membrana plasmática, por testar uma de suas propriedades: a permeabilidade seletiva (JEYENDRAN et al., 1984; JEYENDRAN et al., 1992). O resultado obtido do HOS-T, para ambos os protocolos de resfriamento, indica que esses foram eficientes em preservar a permeabilidade da membrana plasmática, pois os valores encontrados estão semelhantes aos relatados na literatura, para a espécie canina, tanto para o sêmen resfriado (KUMI-DIAKA e BADTRAM, 1994; ROTA et al., 1995), quanto para o congelado (KUMI-DIAKA, 1993; ENGLAND e PONZIO, 1996).

Os valores obtidos no teste hipo-osmótico demonstram, também, que ambos os protocolos de resfriamento foram eficientes em proteger, até certo ponto, as células espermáticas do choque térmico. Segundo QUINN et al. (1980)

Tabela 3 - Valores percentuais médios e coeficiente de variação (CV) do HOS-T* realizado nas amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever submetidas a diferentes protocolos de resfriamento em caixa de isopor e *biocool*

	Sêmen fresco			Sêmen diluído			Resfriamento	Sêmen resfriado			Sêmen congelado		
	X	CV	D	X	CV	D		X	CV	D	X	CV	D
HOS-T	94,6	1%	1,54	91,1	3%		Isopor	89,4	2%	1,84	68,3	8%	5,88
							Biocool	87,5	2%	2,58	64,5	10%	6,92

* $P > 0,05$.

e WATSON (1995), esse fenômeno se refere a uma sensibilidade peculiar dos espermatozóides ao resfriamento repentino e rápido, podendo levar a uma perda de integridade da membrana plasmática e da função celular. O choque é mais pronunciado quando o resfriamento ocorre rapidamente, na faixa de temperatura entre 12 a 0°C.

A queda de temperatura nessa faixa crítica, citada por QUINN et al. (1980) e WATSON (1995) expendeu cerca de 50 minutos para ocorrer na caixa de isopor e 20 minutos no *biocool* (Figuras 2 e 3). Parece, portanto, que apesar das curvas de resfriamento impostas terem sido diferentes, ambas foram eficientes em minimizar o choque térmico nas células espermáticas, permitindo que uma porcentagem alta delas, fosse responsiva ao teste. Segundo DARIN-BENNETT et al. (1974) a susceptibilidade da membrana plasmática dos espermatozóides ao choque térmico varia entre as espécies animais e os espermatozóides canino são menos susceptíveis, talvez por isso, suportem variações na curva de resfriamento.

A avaliação da condição de acrossoma dos espermatozóides revelou que não houve diferença ($P > 0,05$), entre os protocolos de resfriamento do sêmen, em qualquer uma das etapas do processamento (Tabela 4). Em valores absolutos, a

Tabela 4 - Valores percentuais médios e coeficiente de variação (CV) da condição de acrossoma* dos espermatozóides nas amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes protocolos de resfriamento em caixa de isopor e *biocool*

	Sêmen fresco			Resfriamento	Sêmen resfriado			Sêmen congelado		
	X	CV	D		X	CV	D	X	CV	D
Condição de Acrossoma	97,4	1%	0,99	Isopor	89,8	5%	5,08	67,7	10%	7,43
				Biocool	88,9	5%	5,02	64,1	10%	6,41

* $P > 0,05$.

quase igualdade dos resultados, quanto à integridade de acrossoma indica, novamente, que ambos os protocolos de resfriamento foram satisfatórios, já que os valores obtidos são bastante similares aos relatados na literatura (ENGLAND e PONZIO, 1996; STROM et al., 1997; PEÑA et al., 1998a ; PEÑA et al., 1998b; ROTA, 1998).

Pelo resultado do HOS-T, foi possível determinar que a região da cauda dos espermatozóides foi poupada de lesões graves, durante o resfriamento e a congelação. Já pelo resultado da avaliação do acrossoma, foi possível verificar que a região da cabeça espermática também foi poupada, até certo ponto. Segundo WATSON (1995), a membrana acrossomal é um dos sítios espermáticos, mais suscetível a lesões causadas pelo choque térmico e pela criopreservação.

A longevidade dos espermatozóides foi superior para o sêmen resfriado na caixa de isopor, que o sêmen resfriado no *biocool*, após a descongelação das amostras de sêmen (Tabelas 5 e 6; Figura 4).

A longevidade dos espermatozóides depende de fatores como: manutenção da viabilidade e funcionalidade celular. Para a célula se manter funcionando necessita que suas reservas energéticas estejam disponíveis

Tabela 5 - Valores percentuais médios (X) e coeficiente de variação (CV) de motilidade espermática progressiva durante o TTR, em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes protocolos de resfriamento em caixa de isopor e *biocool*

Etapas da Criopreservação		TTR – (Minutos)														
		0			30			60			90			120		
		X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D
Fresco		91,6	2%	2,4	84,6	7%	6,3	79,0	4%	7,6	73,0	14%	10,9	69,0	14%	10,3
Diluído		91,0	3%	2,8	83,0	5%	4,9	76,0	5%	3,8	68,6	9%	6,6	63,3	15%	9,5
Resfriado	Isopor	79,0a	5%	4,7	71,6a	7%	5,5	63,3a	13%	8,7	55,0a	23%	13,0	46,0a	36%	16,7a
	Biocool	78,6a	5%	4,0	71,3a	9%	6,9	62,0a	16%	10,1	50,3a	32%	16,3	40,6a	44%	17,9a
Congelado	Isopor	65,0a	9%	5,9	50,6a	8%	4,5	45,3a	11%	5,1	41,0a	26%	10,7	38,3a	31%	12,0a
	Biocool	56,0b	11%	6,6	42,3b	7%	3,1	36,6b	12%	4,4	30,3b	28%	8,5	27,3b	37%	10,3b

As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna e por etapas de criopreservação, diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Tabela 6 - Valores médios e coeficiente de variação de vigor espermático obtidos durante o TTR, em amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a dois protocolos de resfriamento em caixa de isopor e *biocool*

Etapas da Criopreservação		TTR – (Minutos)														
		0			30			60			90			120		
		X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D	X	CV	D
Fresco		4,0	12%	0,5	4,0	15%	0,6	4,0	17%	4,9a	3,0	23%	0,7	3,0	26%	0,8
Diluído		4,0	12%	0,5	4,0	10%	0,4	4,0	12%	6,1a	3,0	16%	0,5	3,0	16%	0,5
Resfriado	Isopor	3,0	13%	0,4a	3,0	10%	0,3a	3,0	13%	19,1a	2,0	40%	0,8a	2,0	35%	0,7 ^a
	Biocool	3,0	16%	0,5a	3,0	13%	0,4 ^a	3,0	20%	21,9a	2,0	35%	0,7a	2,0	35%	0,7 ^a
Congelado	Isopor	3,0	10%	0,3a	3,0	6%	0,2a	3,0	13%	10,4a	2,0	35%	0,7a	2,0	35%	0,7 ^a
	Biocool	3,0	10%	0,3a	2,0	25%	0,5b	2,0	25%	12,6b	1,5	40%	0,6b	1,5	53%	0,8b

As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna e por etapas de criopreservação, diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

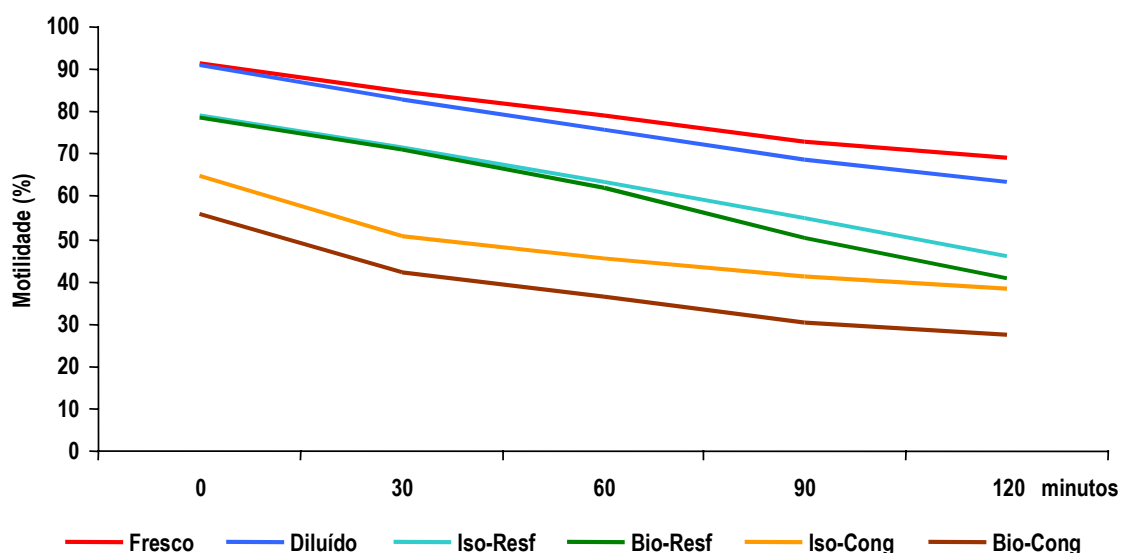


Figura 4 - Curvas da motilidade espermática progressiva (%) durante o TTR de amostras de sêmen de cães da raça Labrador do Retriever, submetidas a diferentes protocolos de resfriamento em caixa de isopor e *biocool*.

(WATSON, 1995). Assim, parece que os espermatozóides que foram submetidos ao resfriamento na caixa de isopor, por terem tido sua temperatura diminuída mais rapidamente, no início do processamento, mantiveram por mais tempo suas reservas energéticas. Tal fato foi notado na motilidade espermática, imediatamente após a descongelação, e se manteve nos momentos subseqüentes do TTR.

Os valores encontrados do TTR para o sêmen canino congelado corroboram os resultados de THOMAS et al. (1992) e HAY et al. (1997), sendo que esses autores, também utilizaram o meio Tris-citrato-gema de ovo, como diluidor do sêmen e, após duas horas de incubação, relataram motilidade espermática de 30 a 40%, porém mantiveram o sêmen a 22°C e a 4°C, respectivamente.

De modo geral, os resultados de todos os testes *in vitro* realizados no presente estudo foram superiores aos obtidos no Capítulo I e se forem consideradas as metodologias empregadas nos dois Capítulos (I e II) para as amostras de sêmen diluídas no meio Tris-citrato (ROTA et al., 1995; modificado)

e resfriadas na caixa de isopor, em ambos os capítulos, a única etapa da criopreservação que diferiu foi a descongelação. Essa etapa foi lenta no Capítulo I (37°C por 50 segundos) e rápida no presente Capítulo (75°C por 6 segundos).

Na literatura, relata-se que a taxa de descongelação influencia na longevidade espermática (ENGLAND, 1993; ROTA et al., 1998). Esses autores citam que, na espécie canina, a descongelação rápida é superior a descongelação lenta, no sentido de aumentar a sobrevivência e longevidade espermáticas.

Os resultados dos testes com a taxa de descongelação lenta no Capítulo 1 foram, praticamente todos, inferiores aos resultados dos testes nas amostras de sêmen que foram descongeladas com a taxa rápida, nesse Capítulo. Essa inferioridade foi mais marcante no TTR, sendo que a motilidade espermática, após 2 horas de incubação do sêmen, que foi descongelado a 37°C por 50 segundos, foi em torno de 12%, enquanto com a taxa rápida de descongelação foi de 38%. Portanto, parece que a taxa de descongelação influenciou sobremaneira nos resultados.

Resultados semelhantes foram encontrados por OLAR et al. (1989), England (1992) citado por ROTA et al. (1998), IVANOVA-KICHEVA et al. (1995) e ROTA et al. (1998). Sendo que esses autores relataram melhor qualidade espermática, quanto a motilidade e a longevidade, nas amostras de sêmen descongeladas com taxas rápidas.

Segundo WATSON (1995) se a taxa de congelação empregada for rápida a taxa de descongelação também deve ser rápida, para se evitar a ocorrência do fenômeno de recristalização migratória. Esse fenômeno consiste na formação de grandes cristais de gelo durante a descongelação lenta, que se formam a partir da fusão de cristais de gelo menores, que haviam se organizado durante a congelação. Nesse contexto, a descongelação rápida permite a eliminação dos cristais de gelo, antes desses se reorganizarem.

Parece, portanto, que a descongelação rápida interagiu de maneira mais eficiente com o método de congelação empregado no experimento. Apesar de não ter sido aferida a curva de congelação do presente experimento, OLAR et al. (1989) e DOBRINSKI et al. (1993) relataram taxas de congelação obtidas em

condições semelhantes (vapor de nitrogênio líquido, com as palhetas sendo colocadas a diferentes alturas do nível nitrogênio), como sendo taxas rápidas. Extrapolando esses achados para o presente experimento, pode-se dizer que utilizou-se a taxa rápida de congelação, o que, portanto, justifica os melhores resultados com a descongelação rápida.

Por meio dos resultados apresentados, pôde-se observar que os dois protocolos utilizados para o resfriamento do sêmen canino foram satisfatórios, no sentido de minimizar as alterações deletérias sofridas pelo espermatozóide, que podem advir do choque térmico durante o resfriamento e, principalmente, da criopreservação, que é um processamento altamente estressante à célula espermática (WATSON, 1995).

Segundo ENGLAND (1993), se o período de resfriamento for controlado, irá preparar a célula espermática para a criopreservação, pois a membrana plasmática adquire resistência, interagindo com os fosfolípidos da gema de ovo e ocorrem fluxos iônicos favoráveis para a sobrevivência da célula. Pôde-se inferir, portanto, que os protocolos de resfriamento empregados foram favoráveis nesse sentido. O resultado de igualdade entre os mesmos em praticamente todos os testes aplicados, com exceção de superioridade do protocolo com a caixa de isopor, quanto à motilidade espermática progressiva e à longevidade espermática, parece ter deixado claro que a utilização desse método é viável.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A criopreservação do sêmen na espécie canina requer cuidados durante sua realização para a manutenção da viabilidade espermática. Entre esses cuidados está a monitoração dos períodos de resfriamento e equilíbrio, para se evitar, principalmente, choque térmico. Assim, testou-se dois métodos de resfriamento do sêmen, utilizando caixa de isopor e congelador programável de células (*biocool*).

Os testes empregados na avaliação das amostras seminais foram: motilidade espermática progressiva e vigor espermático, integridade de membrana plasmática e do acrossoma, por meio do teste hipo-osmótico e de observação do acrossoma em câmara úmida, respectivamente e longevidade espermática, por meio do teste de termo-resistência.

O resfriamento na caixa de isopor obteve melhores resultados nos testes de motilidade espermática e TTR, logo após a descongelação do sêmen, porém em todos os outros testes não houve diferença entre os tratamentos.

Parece que a curva imposta às amostras de sêmen resfriadas na caixa de isopor foi mais eficiente em manter a longevidade espermática no sêmen congelado, talvez por ter causado, inicialmente, uma queda mais rápida na temperatura, o que ocorreu devido ao resfriamento na caixa não ter sido constante, como no *biocool*. Essa queda rápida de temperatura pode ter sido

benéfica por diminuir o metabolismo espermático e, conseqüentemente, manter as reservas energéticas da célula por mais tempo.

Os resultados demonstraram que ambos os tratamentos foram eficientes para o resfriamento do sêmen que irá ser criopreservado, devido aos valores encontrados nos testes mostrarem-se satisfatórios. Conclui-se, portanto, que os tratamentos aplicados, considerando-se os resultados de testes *in vitro*, foram adequados para o resfriamento do sêmen canino.

3. RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS

A criopreservação do sêmen na espécie canina vem sendo desenvolvida há cerca de quarenta anos e, no entanto, ainda existem muitos pontos a serem estudados e discutidos para a obtenção da metodologia ideal. Entre esses pontos estão a escolha do meio diluidor adequado e o método que deve ser utilizado para o resfriamento do sêmen, ambos visando a proteção da célula espermática para a congelação e descongelação, que são processos que alteram, sobremaneira, a viabilidade do espermatozóide.

Ponderando-se sobre esse aspecto, comparou-se os meios diluidores Tris-citrato e Tes-Tris, já que ambos têm sido utilizados para a criopreservação de sêmen com a obtenção de bons resultados. Mediante ao encontrado, pode-se afirmar que na análise comparativa desses diluidores o meio Tris-citrato demonstrou-se superior na manutenção da qualidade espermática, por ter obtido os melhores resultados nos testes de motilidade e vigor espermáticos, hiposmótico, condição de acrossoma e TTR, após a descongelação do sêmen.

Comparou-se dois métodos de resfriamento de sêmen canino, sendo um no *biocool* (congelador de células) e o outro em uma caixa de isopor, que consiste em um método bastante prático e não oneroso. Como a curva de resfriamento imposta ao sêmen na caixa de isopor não é totalmente controlada, enquanto no *biocool* é possível esse controle, o intuito foi de testar a viabilidade

da caixa, comparando a qualidade espermática do sêmen resfriado em ambos os métodos, após o resfriamento e a descongelação.

Para a análise comparativa desses métodos foram realizados testes *in vitro* nas amostras seminais e os resultados evidenciaram que não houve diferença entre os mesmos sobre a qualidade espermática, tanto após o resfriamento, quanto após a descongelação das amostras de sêmen; com exceção dos resultados de motilidade e TTR após a descongelação, que foram superiores na caixa de isopor, indicando uma superioridade desse método, perante ao *biocool*. Assim, parece claro que a caixa de isopor pode ser indicada para o resfriamento do sêmen canino.

No presente estudo foi possível concluir que o sêmen canino criopreservado pode ser diluído em meio Tris-citrato e resfriado em caixa de isopor, perante as condições apresentadas. No entanto, para a viabilização completa desses métodos, fazer-se-á necessário análises *in vivo* do sêmen, que possam vir a comprovar os resultados satisfatórios encontrados nos testes *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P.H.P., ABREU, J.J., COSTA, M.E.L.T., ABREU, C.P. Coleta e Avaliação de sêmen canino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.46, p.537-544, 1994.
- ALLER, J.F., ALBERIO, R.H., IOVANNITTI, B., CABODEVILA, J. Criopreservación de embriões mamíferos 1^a. Parte: Características generales de la congelación. **Rev. de Med. Veter.**, v.76, p.132-136, 1995.
- AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predict accurately? **J. of Androl.**, v.10, p.89-98, 1989.
- AMANN, R.P., HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **J. of Androl.**, v.14, p.397-406, 1993.
- ANDERSEN K. Artificial insemination and storage of canine semen. In: MORROW, A. (Ed.) **Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals**. Philadelphia: Saunders, 1980. p.661-665.
- ANDERSEN, K. Fertility of frozen dog semen. **Acta Vet. Scand.**, v.13, p.128-130, 1972.
- AUGHEY, E., RENTON, J.P. The ultra-structure of abnormal spermatozoa in a stud dog. **J. Reprod. and Fert.**, v.25, p.303-304, 1971.
- BARTLETT, D.J. Studies on dog semen- II. Biochemical characteristics. **J. Reprod. and Fert.**, v.3, p.190-205, 1962.

- BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R.S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriog.**, v.34, p.147-157, 1990.
- BUENO, R., COSTA, E.P., GUIMARÃES, J.D., VALENTIN, F.M. Infertilidade associada a espermiogênese imperfeita no cão – Relato de um caso. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, p.460-461, 1999.
- CHECK, M.L., CHECK, J.H., LONG, R. Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane. **Arch. of Androl.**, v.27, p.155-160, 1991.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. Belo Horizonte: 1998. 49p.
- CROSS, N.L., MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. **Biol. of Reprod.**, v.41, p.635-641, 1989.
- CUNHA, I.C.N., LOPES, M.D. Efeitos da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, p.306-307, 1999.
- DARIN-BENNETT, A., POULOS, A., WHITE, I.G. The phospholipids and phospholipids-bound fatty-acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. **J. of Reprod. and Fertil.**, v.41, p.471-474, 1974.
- DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondante du sperme congelé. **Ann. Méd. Vét.**, v.4, p.215-224, 1967.
- DOBRINSKI, I., LULAI, C., BARTH, A.D., POST, K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.291-296, 1993.
- DOEBBLER, G.F. Crioprotective compounds – review and discussion of structure and function. **Cryobiol.**, v.3, p.2-11, 1966.
- EDWARDS, D.F., PATTON, C.S., KENNEDY, J.R. Primary ciliary dyskinesia in the dog. **Prob. Vet. Med.**, v.4, p.291-319, 1992.
- ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. **Theriog.**, v.37, p.373-381, 1992.
- ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Seminal characteristics and fertility in dogs. **Vet. Rec.**, v.125, p.399, 1989.

- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.243-255, 1993.
- ENGLAND, G.C.W., PLUMMER, J.P. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.261-270, 1993.
- ENGLAND, G.C.W., PONZIO, P. Comparisons of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriog.**, v.46, p.165-171, 1996.
- ESTEVEES, S.C., SHARMA, R.K., THOMAS, A.J., AGARWAL, A. Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm. **Fertil. and Steril.**, v.66, p.798-804, 1996.
- EUCLYDES, R.F. **Sistema de análise estatística e genética (SAEG)**. Viçosa, MG: UFV, 1992. 62p.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiol.**, v.23, p.1-13, 1986.
- FARSTAD, W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. **J. Small Anim. Pract.**, 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, 1996. 785 p.
- FERGUSON, J.M., RENTON, J.P., FARSTAD, W., DOUGLAS, T.A. Insemination of beagle bitches with frozen semen. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.39, p.293-298, 1989.
- FONTBONNE, A., BADINAND, F. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.531-532, 1993.
- 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 Vet.**, v.54, p.78-89, 1964.
- FOOTE, R.H. The effects of electrolytes, sugars, glycerol and catalase on survival of dog semen stored in buffered-yolk mediums. **Am. J. Vet. Res.**, v.104, p.32-36, 1964.

- 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. **Am. J. Vet. Res.**, v.31, p.1807-1813, 1970.
- GOVETTE, G., LINDE-FORSBERG, C., STROM, B. A successful concept for freezing of dog semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 13, 1996, Sydney. **Proceedings...** Sydney: ICAR, 1996. v.2, p.5-8.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. of Androl.**, v.11, p.73-88, 1990.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **J. Roy. Microsc. Soc.**, v.76, p.84-97, 1957.
- HAY, M.A., KING, W.A., GARTLEY, C.J., LEIBO, S.P., GOODROWE, K.L. Canine spermatozoa- cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriol.**, v.48, p.1329-1342, 1997.
- HOSSAIN, A.M., RIZK, B., BARIK, S., HUFF, C., THORNEYCROFT, I.H. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. **Hum. Reprod.**, v.13, p.1578-1583, 1998.
- HRUDKA, F. Acrossoma-nuclear syndrome in canine sperm. **Androl.**, v.15, p.310-321, 1983.
- IVANOVA-KICHEVA, M.G., SUBEV, M.S., BOBADOV, N.D., DACHEVA, D.P., ROUSEVA, I.A. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. **Theriog.**, v.44, p.563-569, 1995.
- IANAMASSU, A., UECHI, E., LOPES, M.D. Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, p.302-304, 1999.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Vet.**, v.10, p.156-165, 1994.
- JEDRZEJCZAK, P., PISARKI T., KURPISZ, M. Evaluation of sperm cryoprotective media in respect to fertilizing capacity tested *in vitro*. **Androl.**, v.28, p.175-183, 1996.

- JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M., CRABO, B.G., ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fert.**, v.70, p.219-228, 1984.
- JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., ZANEVELD, L.J.D. The hypoosmotic swelling test: an update. **Arch. of Androl.**, v.29, p.105-116, 1992.
- JEYENDRAN, R.S., ZANEVELD, L.J.D. Controversies in the development and validation of new sperm assays. **Fertil. and Steril.**, v.59, p.726-728, 1993.
- JOHNSTON, S.D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Vet. Clin. of North Am.: Small Anim Pract.**, v.21, p.545-551, 1991.
- KAWAKAMI, E., HORI, T., TSUTSUI, T. Changes in semen quality and *in vitro* sperm capacitation during various frequencies of semen collection in dogs with both asthenozoospermia and teratozoospermia. **J. Vet. Med. Sci.**, v.60, p.607-614, 1998.
- KUMI-DIAKA, J., BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. **Theriog.**, v.41, p.1355-1366, 1994.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriog.**, v.39, p.1279-1289, 1993.
- LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extend semen. **Vet. Clin. of North America: Small Anim. Pract.**, v.21, 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 Anim.)**, v.10, 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. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.39, p.299-310, 1989.
- LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.313-323, 1993.
- LINDE-FORSBERG, C., HOLST, B.S., GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen : a retrospective study. **Theriogenology**, v.52, p.11-23, 1999.

- MC LAUGHLIN, E.A., FORD, W.C.L., HULL, G.R. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.95, p.527-534, 1992.
- MELO, M.I.V. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino**. Belo Horizonte: UFMG, 1999. 104p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5. ed. Porto Alegre: Sulina, 1982, v.2, 783p.
- MORTON, D.B., BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.39, p.311-316, 1989.
- MORTON, D.B. Review on the use of frozen semen in dog breeding. **Anim. Technol.**, v. 37, n. 1, p. 67-71, 1986.
- MOURA, C.S., CAVALCANTI, M.C.O., GUERRA, M.C.O., TAVARES, P.T.S. Criopreservação de sêmen canino utilizando diferentes métodos de refrigeração. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, p.304-305, 1999.
- NEILD, D., CHAVES, G., FLORES, M., MORA, N., BECONI, M., AGUERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriog.**, v.51, p.721-727, 1999.
- NOTHLING, J.O., GERSTENBERG, C., VOLKMANN, D.H. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.51, p.109-116, 1997.
- NOTHLING, J.O., GERSTENBERG, C., VOLKMANN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – A retrospective study. **Afric. Vet. Ass.**, v.66, p.49-55, 1995.
- OETTLÉ, E.E. Changes in acrossome morphology during cooling and freezing of dog semen. **Anim. Reprod. Science**, v.12, p.145-150, 1986.
- OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.257-260, 1993.
- 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, p.451-461, 1989.

- OLIVEIRA, J.V.L., BARRETO, C.S., FILHO, A.I.R. Avaliação de sêmen canino pós-descongelção, utilizando-se tris-gema e lactose-gema em quatro diferentes períodos de equilíbrio. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, p.308-309, 1999.
- PEÑA, A., BARRIO, F., QUINTELA, L.A., HERRADÓN, P.G. Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. **Reprod. Dom. Anim.**, v.33, p.5-9, 1998a.
- PEÑA, A., BARRIO, F., QUINTELA, L.A., HERRADÓN, P.G. Effect of different glicerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. **Theriog.**, v.50, p.163-174, 1998b.
- PEREZ, L.J., VALCÁRCEL, A., HERAS, M.A., BALDASSARRE, H. Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in ovine and bovine frozen-thawed samples. **Reprod. Dom Anim.**, v.32, p.157-160, 1997.
- QUINN, P.J., CHOW, P.Y.W., WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **J. Reprod. Fert.**, v.60, p.403-407, 1980.
- RENTON, J.P., HARVEY, M.J.A., HARKER, S. A spermatozoal abnormality in dogs related to infertility. **Vet. Rec.**, v.118, p.429-430, 1986.
- RODRIGUEZ-GIL, J.E., MONTSERRAT, A., RIGAU, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrossome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriog.**, v.42, p.815-829, 1994.
- ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C., VANOZZI, J., ROMAGNOLI, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. In: ROTA, A. (ED.) **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1998. p.1-15.
- 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. **Theriog.**, v.51, p.1045-1058, 1999.
- ROTA, A., STROM, B., LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. **Theriog.**, v.44, p.885-900, 1995.

- ROTA, A., STROM, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of EQUEZ STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriog.**, v.47, p.1093-1101, 1997.
- 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 Agriculturae Sueciae Veterinaria, 37.
- SEAGER, S.J., FLETCHER, W.S. Progress on the use of frozen semen in the dog. **Vet. Rec.**, v. 92, p. 6-10, 1973.
- SEAGER, S.J., PLATZ, C.C., FLETCHER, W.S. Conception rates and related data using frozen dog semen. **J. Reprod. Fert.**, v.45, p.189-192, 1975.
- 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, 1986. p.539-541.
- SEAGER, S.J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. **A. I. Digest.**, v.17, p.6-16, 1969.
- SILVA, L.D.M., ONCLIN, K., LEJEUNE, B., VERSTEGEN, J.P. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Vet. Rec.**, v.17, p.154-157, 1996.
- SILVA, L.D.M., VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriog.**, v.44, p.571-579, 1995.
- SIRIVAIIDYANPONG, S. CHENG, F.P., MARKS, A., Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriog.**, v.53, p.789-802, 2000.
- SODERQUIST, L., MADRID-BURY, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriog.**, v.48, p.1115-1125, 1997.
- STROM, B., ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriog.**, v.48, p.247-256, 1997.
- THOMAS, P.G.A., LARSEN R.E., BURNS, J.M., HAHN, C.N. A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. **Theriog.**, v.40, p.1199-1205, 1993.

- THOMAS, P.G.A., SURMAN, V. MYERS-WALLEN, V.N., CONCANNON, P.W., BALL, B.A. Addition of sodium dodecyl sulphate to tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 12, 1996, Sydney. **Proceedings...** Hague: ICAR, 1992. v.4, p.1823-1825.
- VAN DER BERG, L., SOLIMAN, F.S. Effect of glicerol and dimethyl sulfoxide on changes in composition and pH of buffer salt solution during freezing. **Cryobiol.**, v.6, p. 93-97, 1969.
- VAN DER VEN, H.H., JEYENDRAN, R.S., AL-HASANI, S., PEREZ-PELAEZ, M., DIEDRICH, K., ZANEVELD, L.J.D. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (HOS-T) and in vitro fertilization. **J. of Androl.**, v.7, p.190-196, 1986.
- VASQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., MARTINEZ, P., GARCIA-ARTIGA, C., ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. **Theriog.**, v.47, p.913-922, 1997.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **J. Reprod. Fert.**, 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. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.871-891, 1995.
- WILSON, M.S. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **J. Reprod. Fertil.**, v.47, p.307-311, 1993.
- YAVETZ, H., HAUSER, R., YOGEV, L., BOTCHAN, A., LESSING, J.B., HORMONNAI, Z.T., PAZ, G. Advanced methods for evaluation of sperm quality. **Androl.**, v.27, p.31-35, 1995.
- YUBI, A.C., FERGUSON, J.M., RENTON, J.P., HARKER, S., HARVEY, M.J., BAGYENJI, B., DOUGLAS, T. Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen. **J. Small Anim. Pract.**, v.28, p.753-761, 1987.
- ZAVOS, P.M. Hypoosmotic swelling test (HOS)/Functional integrity of sperm membrane. **Assisted Reprod. Technol. and Androl.**, v.2, p.215-216, 1991.