

ANTONIO CARLOS CSERMAK JUNIOR

**USO DE SONDAS FLUORESCENTES E DO ENSAIO DE LIGAÇÃO DO
ESPERMATOZOIDE DO CÃO (*Canis lupus familiaris*) À MEMBRANA PERIVITELINA
DO OVO DE GALINHA (*Gallus gallus*) COMO MÉTODO PARA PREDIÇÃO DA
CAPACIDADE FERTILIZANTE DO SÊMEN**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

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

T

C958u
2011

Csermak Junior, Antonio Carlos, 1979-

 Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozoide do cão (*Canis lupus familiaris*) à membrana perivitelina do ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen / Antonio Carlos Csermak Junior. – Viçosa, MG, 2011.

 x, 71f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

 Inclui anexos.

 Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

 Inclui bibliografia.

 1. Cão - Reprodução. 2. Reprodução animal. 3. Sêmen - Análise. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

 CDD 22. ed. 636.08926

ANTONIO CARLOS CSERMAK JUNIOR

**USO DE SONDAS FLUORESCENTES E DO ENSAIO DE LIGAÇÃO DO
ESPERMATOZOIDE DO CÃO (*Canis lupus familiaris*) À MEMBRANA PERIVITELINA
DO OVO DE GALINHA (*Gallus gallus*) COMO MÉTODO PARA PREDIÇÃO DA
CAPACIDADE FERTILIZANTE DO SÊMEN**

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

APROVADA: 16 de dezembro de 2011

José Domingos Guimarães
(Coorientador)

Eduardo Paulino da Costa
(Coorientador)

Juliano Vogas Peixoto

Mariana Machado Neves

Tarcízio Antônio Rego de Paula
(Orientador)

Aos meus pais, Antonio Carlos e Maria Aparecida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, principalmente pelo gosto pela vida.

Agradeço aos meus pais Antonio Carlos e Maria Aparecida, pelo amor e dedicação de sempre e por tudo que representam. Sem o apoio incondicional de vocês a vida seria difícil, e sem vocês, não teria sem sentido.

Aos meus irmãos Caio e Raquel, simplesmente por existirem.

Aos meus familiares que sempre estiveram por perto e sempre me fazem mais feliz. Tios, primos, agregados. À D. Ana e Lelê, *in memoriam*, que continuarão por perto sempre. Ao meu sobrinho que está chegando. Ao Bruno Perrella por ser tão presente. Todos me deram momentos bons o suficiente pra não precisar reclamar da correria da vida.

Ao Professor Tarcízio. Devido a esta pessoa conheci minha profissão, uma profissão que além de prazerosa dá mais sentido pra vida (pra minha pelo menos). Pela sua amizade e confiança em nós, seus orientados, agradeço. Por todos os conselhos agradeço, pela compreensão também e por muito mais. Pela inspiração e pela figura paterna que representa.

Ao Professor Eduardo Paulino da Costa por toda a ajuda, pelos conselhos, e direcionamento nos trabalhos conduzidos em seu laboratório.

Ao professor José Domingos Guimarães, JD, pela boa prosa, disponibilidade, pelo incentivo e pela ajuda com a estatística.

À Prof^a Mariana Machado Neves pelo apoio e incentivo, ajuda e simpatia.

Ao casal 20 Gê e Thyara. Sem a ajuda deles este experimento não aconteceria. Por toda a dedicação e companheirismo de vocês agradeço.

A todos os integrantes da nossa equipe de pesquisa em reprodução de animais silvestres pelo apoio, interesse e ajuda. Rafael Garay, Letícia Bergo, Leanes, Graziella Vasconcelos, Rafael Magaldi, e aos dedicados estagiários Márcia, Antônio, Saulo, Wesley e Paulo, bem como aos novos companheiros de pesquisa Vini, Felipe Tavares, Aiyasa.

Aos amigos e companheiros de profissão que por hora não desconfiem, mas ajudaram muito: Marcos Rodrigues, Moacir, Juliano, Dudu, Mariana e Natasha.

Ao meu companheiro e amigo Paschoal pela amizade, fidelidade e por se dedicar também à ciência, participando do meu experimento. Meu cachorro.

À minha grande amiga Mariângela, ao Bôia Nervosa, Roots, Alex Tripa Seca, Nicola, Rodrigo Landiose, Fredoca, Jones, Douglas, Baby, Mônicaalmon, Aldinho, Mara Baltazar, Raquel Giacomini, Marcos Andersen, Predo Waddington, e mais 20 páginas de amigos...Não sei nem por onde começar a explicar a importância de vocês.

Ao pessoal que muito me ajudou, do laboratório do Prof. Eduardo Paulino. À Vívian, à Ana Clara, ao Pedro, muito agradeço.

À Sanely por tornar os momentos no laboratório tão agradáveis pela prosa boa e amizade, e por conseguir fazer a gente rir sempre.

Ao Gian, pela recepção, paciência, profissionalismo e ensinamentos desde que resolvi trabalhar com reprodução animal. Um camarada, companheiro de curso e professor.

Ao Emílio por todo o apoio e ajuda.

Ao pessoal do Laboratório de Andrologia Animal pela ajuda: Priscila, Luciana, Alberto, Rogério, Jhonata.

Ao Madriano e Júlio pelo auxílio e dedicação no ensino do uso da membrana perivitelina.

Ao Prof. Patarroyo pelo auxílio e prontidão em ceder seu laboratório para as análises no microscópio de epifluorescência.

Aos amigos e professores da Univiçosa.

Aos funcionários do DVT, especialmente o Luciano, Varney, seu Didi, Margareth.

Ao pessoal do Polo Aquático e à galera da música. Assim a vida fica bem mais tranqüila.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Os canídeos.....	1
1.2. O cão doméstico.....	2
1.2.1. Origem.....	2
1.2.2. O cão como animal de companhia.....	2
1.3. Reprodução assistida.....	3
1.3.1. Importância da reprodução assistida para o cão doméstico e para espécies ameaçadas.....	3
1.3.2. Criopreservação de sêmen e métodos de análise de sêmen.....	6
1.3.3. Uso de sondas fluorescentes para avaliação de sêmen.....	7
1.3.4. Testes de ligação: uso da membrana perivitelina e zona pelúcida.....	9
1.4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
2. Uso de Sondas Fluorescentes como Método de Avaliação da Integridade de Membranas do Espermatozoide de Cão Doméstico (<i>Canis lupus familiaris</i>)	21
Resumo.....	21
Abstract	22
2.1. Introdução	23
2.2. Material e Métodos	26
2.2.1. <i>Animal experimental</i>	26
2.2.2. <i>Protocolo de manipulação do sêmen</i>	26
2.2.3. <i>Análises microscópicas</i>	27
2.2.4. <i>Análise estatística</i>	29
2.3. Resultados e discussão.....	30
2.4. Conclusão.....	38
2.5. Referências Bibliográficas.....	39
3. Uso do ensaio de ligação do espermatozoide do cão <i>Canis lupus familiaris</i> à membrana perivitelina do ovo de galinha <i>Gallus gallus</i> como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen	46
Resumo.....	46
Abstract	47
3.1. Introdução	48
3.2. Material e Métodos.....	50
3.2.1. <i>Animal experimental</i>	50

3.2.2. <i>Protocolo de coleta e manipulação do sêmen</i>	50
3.2.3. <i>Ensaio de ligação do espermatozoide do cão doméstico e membrana perivitelina</i>	52
3.2.4. <i>Análises microscópicas</i>	54
3.4.5. <i>Análise estatística</i>	56
3.3. Resultados e discussão.....	57
3.4. Conclusões.....	63
3.5. Referências Bibliográficas.....	64
4. Conclusão Geral.....	68
ANEXOS.....	69

RESUMO

CSERMAK JUNIOR, Antonio Carlos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2011. **Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozoide do cão (*Canis lupus familiaris*) à membrana perivitelina do ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co-orientadores: Eduardo Paulino da Costa e José Domingos Guimarães.

O processo de congelamento/descongelamento traz prejuízos, alguns irreversíveis, à célula espermática. Dentre estes podem ser citados a perda de motilidade, desestabilização de membranas, e por conseqüência, quedas no potencial fertilizante do espermatozoide. Devido a estas injúrias, testes capazes de avaliar o grau destes danos em um ejaculado tornam-se fundamentais para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes de congelamento/descongelamento. Os testes utilizados na rotina da avaliação de sêmen, contudo, possuem falhas que podem gerar viés de interpretação dos resultados. O uso de sondas fluorescentes vem mostrando bons resultados no que diz respeito à avaliação de organelas e compartimentos específicos destas células, contribuindo assim para uma avaliação mais precisa das lesões celulares. Neste estudo, a associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio, Hoechst 33342 e FITC-PSA mostrou-se eficaz para distinguir diferentes populações de espermatozoides em ejaculados de cão doméstico. Foram distintas as populações: II (membranas plasmática e acrossomal íntegras), IL (membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada), LI (membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra) e LL (ambas as membranas lesionadas). A utilização desta associação também permitiu quantificar e qualificar danos causados pelo processo de congelamento/descongelamento no sêmen desta espécie. Porém, pouca correlação foi observada entre a coloração por sondas fluorescentes e os testes de rotina utilizados na avaliação do sêmen canino, o que sugere a inclusão das sondas nos protocolos de análise de sêmen, uma vez que são indicadores mais precisos de injúrias à célula espermática. Entretanto, nem os testes de rotina e nem as sondas, são eficientes para predizer a capacidade do espermatozoide de ligar-se ao ovócito, evento crucial para a fecundação. Neste sentido, testes de ligação entre

espermatozoides e ovócitos deveriam sempre fazer parte das pesquisas envolvendo avaliação de protocolos de congelamento/descongelamento de sêmen. Uma limitação à interpretação de tais testes seria o efeito fêmea e o *status* metabólico dos ovócitos, o que leva a busca de substratos de mais fácil obtenção e mais homogêneos. A membrana perivitelina do ovo de galinha tem se mostrado eficiente na avaliação da capacidade de ligação do sêmen em diversas espécies. Neste estudo utilizou-se tanto as sondas fluorescentes como os ensaios de ligação para a avaliação do sêmen do cão doméstico, além dos testes utilizados rotineiramente. O teste de ligação de espermatozoides à membrana perivitelina da gema do ovo de galinha apresenta comportamento semelhante aos resultados dos ditos testes de rotina da avaliação do sêmen, assim como os testes com o uso de sondas fluorescentes, apresentando diferença quando comparados sêmen fresco e sêmen descongelado ($p < 0,05$). O número de células coradas pelo iodeto de propídio aumentou do tratamento a fresco para o descongelado, ao passo que as células coradas pelo Hoechst 33342 diminuíram ($p < 0,05$). Neste estudo o teste hiposmótico no sêmen a fresco foi o único teste a correlacionar-se positiva e significativamente com o número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina da gema do ovo de galinha no sêmen descongelado. O comportamento da membrana perivitelina e das sondas entre os tratamentos mostrou sensibilidade da membrana em distinguir sêmens de diferentes potenciais de ligação ($p < 0,05$).

ABSTRACT

CSERMAK JUNIOR, Antonio Carlos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2011. **Use of fluorescent probes and assay of binding dog sperm (*Canis lupus familiaris*) to the perivitelline layer of the chicken egg (*Gallus gallus*) as a method for predicting the fertilizing capacity of semen.** Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co-advisers: Eduardo Paulino da Costa and José Domingos Guimarães.

The process of freeze / thaw brings losses, some irreversible, to the sperm cell. Among these losses may be cited the loss of motility, membrane destabilization, and consequently, decreases in sperm fertilizing potential. Because of these injuries, tests able to assess the degree of damage in an ejaculate become fundamental to the development of more efficient protocols for freezing / thawing. The tests used in routine evaluation of semen, however, have flaws that can lead to bias in interpreting the results. The use of fluorescent probes has shown good results with regard to the evaluation of these specific organelles and cell compartments, thereby contributing to a more accurate assessment of cell damage. In this study, the association of fluorescent probes propidium iodide, Hoechst 33342 and FITC-PSA was effective to distinguish different populations of sperm in ejaculates from domestic dog. Populations were distinct: II (plasma membrane and acrosomal intact), IL (intact plasma membrane and acrosomal lesions), LI (damaged plasma membrane and acrosome intact) and LL (both injured membranes). Use of this association is also possible to quantify and qualify damages caused by the process of freezing / thawing in the semen of this specie. However, little correlation was observed between the staining fluorescent probes and those used for routine testing in the evaluation of canine semen, suggesting the inclusion of probes in a semen analysis protocol, since they are more accurate indicators of injury to the sperm cell. However, neither the routine testing nor probes are effective for predicting the ability of sperm to bind to the oocyte, crucial event for fertilization. In this sense, testing the link between sperm and oocyte should always be part of research protocols involving evaluation of freezing / thawing of semen. A limitation to the interpretation of such tests would be the effect of metabolic status of oocytes, which leads the search for substrates more readily available and more

homogeneous. The perivitelline layer of the hen's egg has been shown effective in evaluating the binding capacity of semen in different species. In this study we used both fluorescent probes such as binding assays for the evaluation of semen of domestic dogs, in addition to the tests used routinely. The binding assay of sperm perivitelline layer of chicken egg yolk provides behavior similar to the results of routine evaluation tests of semen, as well as tests with the use of fluorescent probes, when significant differences are observed compared fresh semen and semen thawed ($p < 0,05$). If in one hand the number of propidium iodidle stained cells increased from fresh to unfrozen treatment, on the other hand, Hoechst 33342 stained cells decreased. In this study, hypoosmotic test in fresh semen was the only test to correlate positively and significantly with the number of bound sperm to the perivitelline layer of chicken egg yolks in frozen-thawed semen. The behavior of probe and periviteline layer between treatments showed that the membrane is sensitive to distinguish semen of different potential binding ($p < 0.05$).

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Os canídeos

Os canídeos são animais pertencentes à ordem carnívora. Esta ordem compreende duas sub-ordens, a Pinnipedia, composta pelos carnívoros aquáticos, e a Fissipedia, composta pelos terrestres. Os carnívoros terrestres são ainda subdivididos em dois grupos, Arctoidea e Canoidea. Neste último grupo, um grupo heterogêneo, encontra-se a espécie utilizada neste estudo, o cão doméstico *Canis lupus familiaris*. São reconhecidos 16 gêneros e 36 espécies como integrantes da família Canidae encontrando-se amplamente distribuídas pelo mundo, desde desertos até regiões árticas (IUCN, 2004).

As espécies integrantes desta família são reconhecidas por traços anatômicos particulares como membros alongados e semi-rígidos que terminam em mão e pés digitígrados, no que tange ao hábito cursorial. As unhas bem desenvolvidas substituem as garras retráteis encontradas em outros carnívoros. Geralmente possuem focinho longo e orelhas eretas. A musculatura relacionada à mastigação é bem desenvolvida, principalmente o músculo masseter, sendo esta característica relacionada ao hábito alimentar. Os dentes caninos são longos e fortes e utilizados para conter e desestabilizar a presa. Os molares e pré-molares, também denominados carnassais, têm a função de cortar o alimento e os incisivos, por fim, não são especializados (DYCE et al., 2004). Apesar da dentição adaptada à dieta carnívora, algumas espécies incluem outros elementos na dieta, como insetos e vegetais, algumas em grande proporção, como o lobo guará, por exemplo (IUCN, 2004).

O comportamento social das diferentes espécies incluídas nesta família vai desde o hábito solitário, como observado em boa parte dos pequenos canídeos de hábito noturno, ao gregário com complexas relações sociais, como no caso do lobo cinzento e do cachorro-vinagre. Em relação ao comportamento reprodutivo é geralmente observada uma gestação ao ano, com duração média de 63 dias, sendo

as ninhadas compostas por mais de um filhote, recebendo cuidados dos pais ou mesmo de outros integrantes do grupo (IUCN, 2004).

1.2. O cão doméstico

1.2.1. Origem

As informações a respeito da origem do cão doméstico são de caráter hipotético, sendo os dados levantados até então inconclusivos. A hipótese mais aceita é de que o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) tenha se originado como uma sub espécie do lobo (*Canis lupus*), sendo assim, descendente direto do lobo cinzento (WAYNE & VILA, 2001). Algumas evidências científicas dão suporte a esta hipótese, como análises evolutivas baseadas na comparação do DNA mitocondrial. Pesquisas baseadas em achados arqueológicos sugerem que o cão doméstico tenha surgido há cerca de pelo menos 12.000 anos, contudo, existem suposições que isto tenha ocorrido de 10.000 a até 15.000 anos atrás. O processo de domesticação provavelmente ocorreu de forma concomitante ao surgimento da espécie, uma vez que os fósseis encontrados destes canídeos estiveram na maioria das vezes associados a fosséis de humanos (GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2001; JOHNSTON et al., 2001; SHELLING et al., 2005).

1.2.2. O cão como animal de companhia

Supostamente, a população de lobos selvagens, ao longo de gerações, teria se dividido em duas: uma de animais propriamente ditos selvagens, e outra de lobos que teriam se adaptado ao convívio humano. Nesta última população encontravam-se os animais que se aproximavam das “vilas” formadas pelo homem, que havia deixado o estilo nômade e adotado o estilo sedentário, gerando lixo e sobras de alimentos em locais fixos. Ao longo de gerações teria sido criada uma população de lobos cada vez menos tímida e disposta a sobreviver a partir das sobras a um baixo custo energético, que aos poucos passou a ser domesticada visando o trabalho e alimentação (LOBÃO, 1992).

Desde então passou a haver uma intensa seleção dos animais para criação de portes e habilidades específicas, como caça, luta, guarda, faro e pastoreio, dentre outras. Este processo culminou na criação de mais de 400 raças com grande diversidade morfológica ao redor do mundo (MASCARENHAS et al., 2006). A população canina mundial é estimada em cerca de 500 milhões de indivíduos, conforme dados apresentados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo em 2009, e nos países emergentes, segundo informações do Instituto Pasteur, a proporção de cães em relação à população humana pode chegar a mais de 16% (REICHMANN et al, 1999). O segmento de mercado voltado aos animais de companhia experimenta vertiginoso crescimento nas últimas décadas, sendo que em 2009, os gastos com alimentação de animais pet chegou a R\$ 6,2 milhões e está estimado para o consumo de suplementos alimentares em U\$ 1,7 bilhões em 2012 nos Estados Unidos (ANFAL PET, 2010).

1.3. Reprodução assistida

1.3.1. Importância da reprodução assistida para o cão doméstico e para espécies ameaçadas

Os métodos utilizados para análise de sêmen são de grande importância para programas de reprodução assistida. Para o cão doméstico, uma das principais utilidades desta ferramenta é a possibilidade de diversificação da base genética das raças desenvolvidas. Estas foram desenvolvidas sob intensa seleção de características estéticas ou habilidades específicas, sendo os cruzamentos, na maioria das vezes, endogâmicos (LEPPANEN et al., 2000). Como consequência deste modelo de seleção mais de 400 doenças geneticamente herdadas são prevalentes em diversas raças (PATTERSON, 1993). Outro problema encontrado é que boa parte dos animais considerados bons reprodutores no sistema de monta natural não o foram no sistema de inseminação artificial, apontando falhas nos protocolos de criopreservação do sêmen canino (MASCARENHAS, 2008). A seleção voltada para fixação de características reprodutivas de interesse, aparentemente também não fez parte dos programas de seleção (LEPPANEN et al., 2000).

O desenvolvimento de tais protocolos são tanto quanto ou mais importantes para espécies ameaçadas. A conservação da biodiversidade representa um grande desafio em função do elevado nível de perturbações antrópicas nos ecossistemas naturais (VIANA & TABANEZ, 1996). Essas perturbações incluem a explosão demográfica da população mundial, a fragmentação e a degradação dos habitats, a caça predatória, o aumento da proximidade entre as comunidades humanas e animais domésticos com populações de animais silvestres e o isolamento de espécies e populações silvestres.

A conservação das espécies está intrinsecamente ligada à manutenção da variabilidade genética. Quando uma população é isolada geograficamente e fica sujeita à uniformidade genética, vários fatores se aliam para desencadear o processo de extinção. Entre estes fatores estão: maior susceptibilidade a doenças, aumento de anormalidades espermáticas e diminuição da fertilidade, desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos afetando a espermatogênese, a ovulação e a morbidade e mortalidade perinatal (O'BRIEN & MCCULLOGH, 1985; WILDT et al., 1987; MUNSON et al., 1996; EIZIRIK et al., 2001).

Um recurso para preservar exemplares dos diversos ecossistemas, bem como das comunidades bióticas das quais fazem parte, é a criação de reservas naturais. No entanto, essas ações nem sempre são suficientes na propagação de pequenas populações e manutenção de uma adequada variabilidade genética (COMIZZOLI et al., 2000). Neste sentido estratégias de conservação *ex situ* objetivam auxiliar na conservação de uma população geneticamente viável por meio de estratégias de reprodução assistida e criopreservação de fontes genéticas (ANDRABI & MAXWELL, 2007).

Contudo, o reduzido número e acesso a animais silvestres, *in situ* e *ex situ*, funciona como um entrave para o desenvolvimento de tais técnicas a tempo de serem utilizadas em planos de conservação de espécies criticamente ameaçadas. O uso de animais domésticos como modelo experimental permite maior capacitação da equipe, o que se traduz em maior eficácia nos trabalhos com animais silvestres, otimizando assim a geração de informações obtidas de um material que pode ser considerado escasso. Neste contexto, o desenvolvimento de biotecnologias de reprodução assistida utilizando animais domésticos filogeneticamente próximos a

espécies silvestres como modelo experimental ganha grande importância (PAULA, 2011). As tecnologias desenvolvidas deste modo podem ser aplicadas em programas de manejo e conservação de espécies selvagens (GOBELLO & CORRADA, 2003; LUVONI et al., 2006). No último século foram extintas pelo menos seis espécies de carnívoros selvagens e cerca de 280 sofrem algum grau de ameaça, sendo deste total, 36 espécies da família canidae (IUCN, 2007). Dentre as espécies de carnívoros ameaçados, dez pertencem à fauna silvestre brasileira (IBAMA, 2007). O desenvolvimento de técnicas de reprodução para estas espécies é de grande importância, subsidiando programas de conservação.

Segundo (SWANSON, 1998) a reduzida população de uma espécie de vida livre torna a permuta genética limitada e os acasalamentos improváveis, sendo muitas vezes necessária a translocação de animais (WILDT & ROTH, 1997). É possível atuar na conservação das espécies ameaçadas com projetos de conservação *in situ* e *ex situ*. A preservação *in situ* envolve estratégias de conservação da população em seu ambiente natural, enquanto a preservação *ex situ* trata da conservação das espécies fora do ambiente natural, em cativeiro (AZEVEDO & YOUNG, 2005). Como estratégia *ex situ*, estão às tecnologias de reprodução assistida como inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões que vem sendo cada vez mais aplicadas (SWANSON, 1998; WILDT & ROTH, 1997). Estas ferramentas merecem séria consideração, especialmente para programas de manejo *ex situ* (WILDT & ROTH, 1997), e poderão ser usadas como coadjuvantes nos programas de reprodução utilizados na maioria dos zoológicos e centros de conservação (WILDT & ROTH, 1997). A fundamentação do manejo da fauna na investigação científica é essencial para a preservação e conservação (OJASTI, 2000).

O desenvolvimento de protocolos de congelamento de sêmen com o objetivo de incluir espécies ameaçadas em bancos de germoplasma, é de grande importância para a manutenção de uma reserva genética de populações (GALLI et al., 2003; ANDRABI & MAXWELL, 2007; RAMOS et al., 2011).

1.3.2. Criopreservação de sêmen e métodos análise de sêmen

A criopreservação de sêmen abriu os horizontes no que diz respeito ao incremento dos índices reprodutivos de plantéis e possibilitou o uso de animais de genética superior para fixação de características positivas em uma população. Dominando esta biotecnologia e seu processo, reprodutores de qualquer parte do mundo podem ter seu material genético armazenado por tempo indeterminado e transportado sem os riscos associados ao transporte do animal e transmissão de diversas doenças. No que tange populações silvestres ou selvagens, a conservação e transporte deste material é de grande importância para a conservação de espécies ameaçadas (ANDRABI & MAXWELL, 2007).

A importação e exportação de sêmen canino têm crescido constantemente e os bancos de sêmen existem em instituições públicas e privadas (FARSTAD, 1996). Apesar do interesse de criadores, os trabalhos envolvendo a criopreservação de sêmen ainda são poucos (THOMASSEN et al., 2006). Os protocolos utilizados foram desenvolvidos sem uma análise adequada dos danos funcionais causados à célula espermática (STROM HOLST, 1999). A baixa qualidade do espermatozoide canino após o descongelamento sugere relação com sua baixa longevidade após este processo, baixa motilidade e baixa penetração no ovócito (LINDE-FORSBERG, et al., 1999; ROTA et al., 1999; THOMASSEN et al., 2006).

Alguns danos causados pela criopreservação podem ser evitados ou pelo menos minimizados pela diluição da amostra em meio adequado para criopreservação. A gema de ovo, por exemplo, é amplamente utilizada como agente estabilizador da membrana plasmática, protegendo-a contra o choque térmico (WATSON, 1990; HOLT, 2000a; LUVONI et al., 2003). Acredita-se que esta ação protetora seja fornecida pela sua ação coloidal no meio e por um componente da gema, uma lipoproteína de baixa densidade. Acredita-se que os detergentes a base de SDS (dodecil sulfato de sódio), como o Equex STM Paste® e Orvus ES Paste® - dissolvam as lipoproteínas da gema de ovo, aumentando seu potencial de penetração na membrana plasmática e, por conseqüência, sua ação crioprotetora (HOLT, 2000b; PEÑA et al., 2003).

Uma limitação encontrada na literatura disponível é a grande variação de metodologias entre experimentações, o que por vezes torna impraticável a comparação de dados (EILTS, 2005). Poucos trabalhos usam a combinação de diversos métodos, comparando-os. A maioria utiliza os testes mais simples de serem realizados como vigor e motilidade, teste de termorresistência (TTR), teste hiposmótico (HOST), e colorações supravitais, como geradores de parâmetros para predição da capacidade fecundante do sêmen, sendo que nem sempre todos eles são utilizados em conjunto. É de grande importância a análise de parâmetros que não são comumente empregados na avaliação de rotina. Com o auxílio destes métodos pode-se quantificar melhor a extensão dos danos causados à célula espermática, permitindo aperfeiçoar os métodos de criopreservação. Contudo, os testes *in vitro* não são capazes de prever a fertilidade de um macho. Somente a taxa de fertilidade *in vivo* expressa um resultado mais seguro acerca da eficácia do protocolo de criopreservação do sêmen (CARDOSO et al., 2005).

1.3.3. Uso de sondas fluorescentes para avaliação de sêmen

As sondas fluorescentes são utilizadas na avaliação da integridade e funcionalidade da célula espermática, avaliando estruturas e compartimentos específicos destas (PETERSON et al., 1974; HALANGK, et al., 1984).

O mecanismo de homeostase depende da integridade da membrana plasmática da célula espermática (AMANN & PICKETT, 1987). Assim, células com a membrana danificada tendem a perder funcionalidade e não sobreviverem no trato genital da fêmea (PARKS & GRAHAM, 1992). Avaliar as injúrias causadas à membrana permite investigar os passos dos protocolos de manipulação, congelamento e descongelamento responsáveis por estes danos. O uso de sondas fluorescentes tem sido largamente utilizado pra este fim. Dentre as sondas fluorescentes que podem ser utilizadas para avaliar-se a integridade da membrana, destacam-se o iodeto de propídio (PI), as sondas Hoechst 33258 (H258) e 33342 (H342), a SYBR-14 e o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA).

O iodeto de propídeo tem afinidade pelo DNA e é incapaz de penetrar a membrana íntegra, contudo passa pela membrana lesada e uma vez dentro da

célula, liga-se ao material genético, emitindo fluorescência vermelha (MAXWELL et al., 1997; ARRUDA et al., 2003). As sondas H258 e H342 também possuem afinidade pelo DNA e ambas coram o núcleo de azul. Todavia a H342 é capaz de atravessar a membrana intacta e o H258 somente é capaz de atravessar a membrana lesada (CELEGHINI, 2005). A SYBR-14, também possui afinidade pelo DNA e cora o núcleo de células com a membrana plasmática intacta de verde (SEGOVIA et al., 2000). O CFDA, atravessa a membrana plasmática intacta e dentro da célula é hidrolisado por esterases não específicas, sendo transformado em carboxifluoresceína livre. Nesta conformação, passa a corar o interior da célula de verde ou amarelo (HARRISON & VICKERS, 1990).

Existem sondas capazes de avaliar a integridade do acrossoma, estrutura responsável pela liberação de enzimas essenciais na penetração do espermatozoide na zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do ovócito, culminando com a fecundação (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Dentre estas sondas está a FITC-PSA. A PSA é uma aglutinina que possui especificidade por glicoproteínas presentes na membrana acrossomal. Contudo, para que a reação possa ser visualizada em microscopia de epifluorescência, esta aglutinina deve ser conjugada a uma fluoresceína, no caso o isotiocionato de fluoresceína (FITC) (FARLIN et al., 1992). Esta associação marca acrossomos lesados em verde amarelado, permitindo a quantificação das células com acrossoma íntegro ou injuriado (ARRUDA et al., 2003).

Outros tipos de sondas fluorescentes podem ser utilizadas para avaliação da função mitocondrial da célula espermática. As mitocôndrias estão dispostas na peça intermediária do espermatozoide, e o ATP produzido por estas estruturas é quem supre a célula com a energia necessária para os batimentos flagelares (COSSON, 1996; HAFEZ & HAFEZ, 2004). As rodaminas e as carbocianinas são as moléculas mais comuns sensíveis ao potencial de membrana mitocondrial, além de não apresentarem toxicidade ao espermatozoide (REERS et al., 1991). A Rodamina 123 (R123), apesar de utilizada para este fim, tem algumas limitações. Uma delas é que a sonda em questão cora todas as células com função mitocondrial sem, contudo, diferenciá-las em membranas de alto ou baixo potencial (SALVIOLI et al., 1997).

Para superar esta limitação pode ser utilizada a sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), um multímero de carbocianina. Esta sonda permite distinguir diferentes potenciais de membrana mitocondrial. A fluorescência emitida muda do verde para o laranja ou vermelho com o aumento do potencial de membrana (REERS et al., 1991).

A partir das características e mecanismos de ação de cada sonda, é interessante a associação de um conjunto destas, de modo que possa ser avaliada a integridade da célula espermática como um todo.

1.3.4. Testes de ligação: uso da membrana perivitelina e zona pelúcida

A maioria dos testes utilizados em rotina para avaliar a qualidade do sêmen utilizam parâmetros que isolados, não têm valor preditivo sobre a capacidade fertilizante do espermatozoide (SANTOS, 2009). Em suínos, por exemplo, ejaculados com motilidade espermática acima de 60% não se prestam como referência para inferir sobre a fertilidade (FLOWERS, 1996). Partindo da premissa que as células espermáticas sofrem danos que podem as inviabilizar durante o processo de congelamento/descongelamento, torna-se necessário a utilização de testes que avaliem esta habilidade (ligação) de forma específica.

Os testes de interação entre gametas são uma opção para avaliar a capacidade de ligação do espermatozoide ao ovócito. Neste tipo de ensaio, podem ser utilizados ovócitos homólogos, da mesma espécie doadora do sêmen, ou heterólogos, de espécies distintas. O primeiro trabalho desenvolvido na área é de 1976, e realizado com a espécie humana (OVERSTREET & HEMBREE, 1976), contudo, teve baixa aceitação devido ao sacrifício de ovócitos humanos, só vindo a ser valorizado com o desenvolvimento das técnicas de fertilização *in vitro* (FRANKEN & OEHNINGER, 2006). A capacidade do espermatozoide de se ligar à zona pelúcida é um evento crítico que culmina na fertilização (MAYENCO-AGUIRRE & PÉREZ-CORTES, 1998). Este evento é dependente de diversos fatores, dentre eles, a motilidade espermática e fluidez da membrana. Deste modo, testes de interação entre gametas são de grande importância na avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen (CARDOSO et al., 2005). Estes testes possuem como

vantagem em relação à fertilização *in vitro* a menor demanda de tempo, uma vez que o teste de ligação não requer a maturação do ovócito (HEWITT & ENGLAND, 1997). Apesar da falha reprodutiva poder ter origem na fêmea, a maioria das evidências apontam problemas no sêmen como a principal razão pelos insucessos de ensaios de fertilização *in vitro* (FIV) (LIU & BAKER, 1992a).

A partir de ensaios realizados com humanos desde os anos 80, o teste de ligação entre gametas homólogos mostrou-se eficaz para distinguir indivíduos pertencentes a grupos, férteis, inférteis e sub-férteis (LIU & BAKER, 1993; OEHNINGER, et al., 1997; BASTIAAN et al., 2002). Mais tarde experimentações feitas em outras espécies como, bovinos (HERRERA et al., 2005), caprinos (SANTOS, 2009), equinos (MEYERS et al., 1996), e no cão (STRÖM HOLST et al., 2000), mostraram a eficiência do ensaio também para estas espécies e outras. Assim sendo, os ensaios *in vitro* de ligação entre espermatozoides e ovócitos homólogos tornam-se obrigatórios para avaliar a capacidade fertilizante do espermatozoide frente aos danos causados pelo processo de congelamento/descongelamento (STRÖM HOLST et al., 2000).

Apesar da maior confiabilidade depositada no teste de ligação, a obtenção dos ovócitos, ou do número adequado de animais, pode ser um fator limitante, bem como seu custo mais elevado (ROTA et al., 1999; TARDIF et al., 1999). Ainda em relação aos ovócitos, a variação individual de qualidade entre as células e suas doadoras, podem gerar viés na interpretação dos resultados (EILTS, 2005; SANTOS, 2009). Em outros casos, como na espécie humana, os entraves são de caráter ético. Todavia, uma das grandes vantagens deste tipo de teste é que ele permite avaliar o que seria o ponto crucial mais próximo do teste final, que seria a fecundação *in vivo*. Este cenário motivou pesquisadores a buscar substratos alternativos para a ligação do espermatozoide, procurando maior padronização das variáveis envolvidas, como o próprio substrato.

Em observações realizadas por Whistart e colaboradores (1997) em ovos de galinhas, descobriu-se que muitos espermatozoides que não haviam fecundado o ovócito, continuavam presos à membrana perivitelina após a passagem do ovo pelo oviduto. A partir de então foram testados os ejaculados de galos de fertilidades conhecidas, porém diferentes, sobre a membrana, obtendo-se correlações

significativas (BARBATO et al., 1998). Outros pesquisadores utilizaram a técnica em mamíferos, obtendo também resultados positivos (AMORIM, 2008; SANTOS, 2009).

O uso da membrana perivitelina tem algumas vantagens em relação aos ovócitos: permite o teste de diferentes partidas de sêmen sobre um mesmo substrato, ou seja, diferentes fragmentos de uma mesma membrana, minimizando a variação embutida ao teste pelo efeito fêmea; a membrana é de obtenção mais fácil e menos dispendiosa que o ovócito.

No mercado, já pode ser encontrado substrato sintético feito a partir da membrana, apresentações comerciais utilizadas em suínos mostraram-se capazes de responder diferentemente frente a ejaculados diferentes (dos REIS et al., 2003).

A obtenção de uma quantidade satisfatória de ovócitos de mamíferos, principalmente carnívoros, domésticos e silvestres requer o uso de muitas fêmeas. A membrana perivitelina é de obtenção mais fácil e menos dispendiosa. Neste sentido, a validação do teste de fertilidade usando membrana perivitelina do ovo de galinhas aparece como uma importante ferramenta no desenvolvimento de protocolos de criopreservação de sêmen de carnívoros domésticos e silvestres. A membrana perivitelina como ferramenta para a avaliação do sêmen do cão doméstico não foi testada ainda.

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, 7, 145-173.

AMORIM, E. A. M. (2008). *Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e eqüinos na qualidade do sêmen*. Tese (doutorado em Zootecnia), Viçosa – MG, 174p.

ANDRABI, S. M. H. & MAXWELL, W. M. C. (2007). A Review of Reproductive Biotechnologies for Conservation of Endangered Species. *Animal Reproduction Science*, 99(3-4), 223 – 243.

ANFAL PET – Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação. (2011) Mercado de suplementos nutricionais Pet. Disponibilidade de acesso: <<http://www.anfalpet.org.br>>. Acessado em 19 de julho de 2011.

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. (2003). Determinação da integridade da membrana plasmática e acorssomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31(Suplemento), 226-227.

AZEVEDO, S. C & YOUNG, R. J. (2005). Treinamento de emas para evitar predadores: Uma estratégia conservacionista. *Science Press*. Disponível em: <http://www.sciencenet.com.br/backup/site_portugues/sciencepress/science49/scipress_49_emas.htm> Acessado em: 27/05/2005.

BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. (1998). A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. *Biology of Reproduction*, 58, 686-699.

BASTIAAN, H. S.; MENKVELD, R.; OEHNINGER, S.; FRANKEN D. R. (2002). Zona pellucida induced acrosome reaction, sperm morphology, and sperm-zona pellucida binding assessments among subfertile men. *J Assist Reprod Genet*, 19, 329-334.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. da. (2005). Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Rev Bras Reprod Anim*, 29(3/4), 179-187.

CELEGHINI, E. C. C. (2005). *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). USP – Pirassununga-SP.

COMIZZOLI, P., MERMILLOD, P., MAUGET, R. (2000). Reproductive Biotechnologies for Endangered Mammalian Species. *Reproduction Nutrition Development*, 40, 493 – 504.

COSSON, J. (1996). A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biology International*, 20(2), 83-94.

dos REIS, G. R.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P.; WEITZE, K. F.; AMANN, R.; KELLERS, C.; ZEMMRICH, J. (2003). Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozoides a um substrato sintético. *Pesq. agropec. bras.*, 38(11), 1343-1349.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. (2004). *Tratado de Anatomia Veterinária*. 3ª ed. Editora Elsevier, Rio de Janeiro. 813p.

EILTS, B. E. (2005). Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, 64, 685-691.

EIZIRIK, E.; KIM, J. H.; RAYMOND, M. M.; GRAWSHAW JR, P. G.; O'BRIEN, S. J.; JOHNSON, W. E. (2001). Phylogeography, Population History and Conservation

Genetics of Jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, 10(1), 65 – 79.

FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. (1992). Assessment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrossomal damage in stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 32, 23-27.

FARSTAD, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 251–260.

FLOWERS, W. L. (1996). Semen evaluation, extension, packaging and transport methods. In: *ANUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 27., 1996, Nashville. Proceedings... Nashville: American Association of Swine Practitioners*, 469-479.

FRANKEN, D. R. & OEHNINGER, S. (2006). The clinical significance of sperm-zona pellucida binding: 17 years later. *Frontiers in Bioscience*, 11, 1227-1233.

GALLI, C.; DUCHY, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59, 599-616.

GOBELLO, C. & CORRADA, Y. (2003). Biotechnology in canine reproduction: an update. *Acta Veterinaria*, 23(1), 30-37.

GRANDJEAN, D. & VAISSAIRE, J. J. (2001). *Enciclopédia do cão Royal Canin*. 1ª ed. Paris: Ed. Aniwa, 635p.

HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. (2004). *Reprodução Animal*. 7ª ed. Barueri, SP: Manole. 513 p.

HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. (1984). Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullene jakulaten. *Archiv Exper Vet medLeipzig*, 38(1), 105-114.

HARRISON, R. A. P. & VICKERS, S. E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88, 343-352.

HERRERA, C.; BROGLIATTI, G.; CAVIA, R.; CONDE, P.; REVORA, M.; PASQUALINI, R. S. (2005). CASA sperm parameters and their relation with *in vitro* fertilization. *Proc 15th Int Congress Anim Reprod Brazil*, 2:411p.

HEWITT, D. A. & ENGLAND, G. C. W. (1997). The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoa performance *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, 50, 123–39.

HOLT, W. V. 2000a. Basic aspects of frozen storage semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 3-22.

HOLT, W. V. 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53, 47-58.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (2003). *Lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>.

IUCN – The World Conservation Union. (2004). *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs - Status Survey and Conservation Action Plan*. Canid Specialist Group.

IUCN – The World Conservation Union. (2007). *Red List of Threatened Species*. Disponível em: <<http://www.iucn.org>>.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. (2001). Canine and feline *theriogenology*. W.B.Saunders (Philadelphia).

LEPPANEN, M; MAKI, K. SALONIEMI, H. (2000). Estimation of heritability of hip dysplasia in German Shepherd Dogs in Finland. *J. Ani. Breed. Geneti.*, 117, 97-103.

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

LIU, D. Y. & BAKER, H. W. G. (1992a). Tests of human sperm function and fertilization *in vitro*. *Fertil. Steril.* 58, 465-483.

LIU, D. Y. & BAKER, H. W. G. (1993). Inhibition of acrosin activity with a Trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biol Reprod* 48, 340-48.

LOBÃO, A. O. (1992). *A origem do cão e domesticação*. Artigos e coletânea. Jornal de Piracicaba, Piracicaba, SP. p.16.

LUVONI, G.C., KALCHSCHMIDT, E., LEONI, S., RUGGIERO, C. (2003). Conservation of feline semen – part I: cooling and freezing protocols. *J. Feline Med. Surg.*, 5, 203-8.

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

MAYENCO-AGUIRRE, A. M.; PÉREZ CORTÉS, A. B. (1998). Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology*, 50, 195-204.

MASCARENHAS, R. M.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; LANNA, L. L.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. (2006) Morfometria macro e microscópica e índices somáticos

dos componentes testiculares de cães sem raça definida, da puberdade à senilidade. *Revista Ceres*, 53, 106-112.

MASCARENHAS, R. M. (2008). *Avaliação individual e racial da qualidade do sêmen canino in natura e criopreservado em diferentes protocolos*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, MG.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. (1997). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction of Fertility and Development*, 8, 1165-1178.

MEYERS, S. A.; LIU, I. K. M.; OVERSTREET, J. W.; VADAS, S.; DROBNIST, E. Z. (1996). Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: comparisons between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 46, 1268-1277.

MUNSON, L., BROWN, J.L., BUSH, M., PACKER, C., JANSSEN, D., REIZISS, S. M., WILDT, D.E. 1996. Genetic Diversity Affects Testicular Morphology in Free-Ranging Lions (*Panthera Leo*) of Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *Journal of Reproduction and Fertility*, 108, 11 – 15.

O'BRIEN, M. K. & MCCULLOGH, D. R. (1985). Survival of Black-Tailed Deer Following Relocation in California. *Journal of Wildlife Management*, 49(1), 115 – 119.

OEHNINGER, S.; FRANKEN, D.; KRUGER, T. (1997). Approaching the next millennium: how should we manage andrology diagnosis in the intracytoplasmic sperm injection era? *Fertil Steril* 67, 434-436.

OJASTI, J. (2000). *Manejo de fauna silvestre neotropical*. Washington, D.C.: Smithsonian Institution.

OVERSTREET, J. W. & HEMBREE, W. C. (1976). Penetration of zona pellucida of non-living human oocytes by human spermatozoa *in vitro*. *Fertil Steril* 27, 815-831.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. (1992). Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38, 209-222.

PAULA, T. A. R. (2011). Reprodução de carnívoros silvestres. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, 35(2), 130-132.

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

PEÑA, A. I.; LUZ, L. L.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P. G.; QUINTALA, L. A. (2003). Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 59, 1725-39.

PETERSON, R. N.; SILVERSTAIN, K.; FREUND, M. (1974). A rapid fluorometry method for the determination of DNA in human semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 41, 485-488.

RAMOS, A. F.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A. S. (2011). Banco Brasileiro de Germoplasma Animal: desafios e perspectivas da conservação de caprinos no Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 35(2), 104-107.

REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. (1991). J-aggregate formation of a corbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, 30, 4480-4486.

REICHMANN, M. L. A. B.; PINTO, H., B. F.; NUNES, V. F. P. (1999). *Vacinação contra a raiva de cães e gatos*. Manual Técnico do Instituto Pasteur, n. 3, 32p Il.

ROTA, A; IGUER-OUADA, M; VERSTEGEN, J. P.; LINDE-FORSBERG, C. (1999). Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, 51, V1045-1058.

SALVIOLI, S.; ARDIZZONI, A.; FRANCESCHI, C.; COSSARIZA, A. (1997). JC-1, but not DiOC6 (3) or a rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 411, 77-82.

SANTOS, M. C. R. (2009). *Avaliação de métodos alternativos para análises da capacidade de ligação do espermatozoide caprino e estudo do polimorfismo no gene Izumo em caprino, devido à ação do congelamento do sêmen*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, MG.

SEGOVIA, M.; JENKINS, J. A.; PANIAGUA-CHAVES, C.; TIERSCH, T. R. (2000). Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology*, 53, 1489-1499.

SCHELLING, C.; GAILLARD, C.; DOLF, G. (2005). Genetic variability of seven dog breeds based on microsatellite markers. *J Anim Breed Genet*, 122, 71-77.

STRÖM HOLST, B.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2000). Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility*, 119, 201-206.

STRÖM HOLST, B. (1999). *In vitro* characterization of cryopreserved canine spermatozoa. Thesis (Doctorat) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 104f.

SWANSON, F. W. (1998). *Curso de Extensão – felinos selvagens, Biotécnicas reprodutivas e conservação*. Setor de Ciências Biológicas, UFPR: Curitiba-PR, p. 5 – 10.

TARDIF, S.; LAFOREST, J. P.; CORMIER, N.; BAILEY, J. L. (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology*, 52, 447-459.

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

VIANA, V. M.; TABANEZ, A. A. J. (1996). Biology and conservation of forest fragments in the Brazilian Atlantic moist forest. In: *Forest patches in tropical landscapes*. Washington: Island Press, p. 151-167.

WATSON, P. F. (1990). Artificial insemination and the preservation of the semen. In: *Marshall's physiology of reproduction*. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, v.2, p.747- 869.

WAYNE, R. K. & VILA, C. (2001). Phylogeny and origin of the domestic dog. In: *The genetics of the dog*, Eds. A. Ruvinsky, J., Sampsom, CAB International. p. 1- 13.

WILDT, D. E. & ROTH, T. R. (1997). Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. *Int. Zoo. Yb.*, 35, 164-172.

WILDT, D. E., BUSH, M., GOODROWE, K. L., PACKER, C., PUSEY, A. E., BROWN, J. L., et al. (1987). Reproductive and Genetic Consequences of Fouding Isolated Lion Populations. *Nature*, 329(6137), 328 – 331.

2. Uso de Nova Combinação de Sondas Fluorescentes como Método de Avaliação da Integridade de Membranas do Espermatozoide de Cão Doméstico (*Canis lupus familiaris*)

Resumo

O uso de sondas fluorescentes é um método específico de análise de compartimentos e organelas celulares frente ao caráter subjetivo de alguns testes de rotina, na avaliação do sêmen. Neste estudo foram utilizadas sondas fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática – iodeto de propídio e Hoechst 33342 -, integridade do acrossoma – FITC-PSA, em sêmen de cão a fresco e descongelado. Os resultados obtidos foram comparados aos resultados dos testes de rotina utilizados na avaliação de sêmen. Todos os testes foram capazes de detectar queda da qualidade pós descongelamento ($p < 0,05$). A associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio, Hoechst 33342 e FITC-PSA mostrou-se eficaz para distinguir diferentes populações de espermatozoides em ejaculados de cão doméstico. Foram distintas as populações: II (membranas plasmática e acrossomal íntegras), IL (membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada), LI (membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra) e LL (ambas as membranas lesionadas). A utilização desta associação também permitiu quantificar e qualificar danos causados pelo processo de congelamento/descongelamento no sêmen desta espécie. Porém, pouca correlação foi observada entre a coloração por sondas fluorescentes e os testes de rotina utilizados na avaliação do sêmen canino, o que sugere a inclusão das sondas nos protocolos de análise de sêmen, uma vez que são indicadores mais precisos de injúrias à célula espermática.

Palavras chave: reprodução assistida, análise de sêmen, criopreservação, canídeos

Abstract

The use of fluorescent probes is a specific method of analysis of compartments and organelles against the subjective nature of some routine testing in the evaluation of semen. In this study we used fluorescent probes to assess the integrity of the plasma membrane - propidium iodide and Hoechst 33342 -, acrosome integrity - FITC-PSA in semen dog fresh and thawed. The results were compared to results of routine tests used in the evaluation of semen. All tests were able to detect decline in quality after thawing ($p < 0,05$). The association of fluorescent probes propidium iodide, Hoechst 33342 and FITC-PSA was effective to distinguish different populations of sperm in ejaculates from domestic dog. Populations were distinct: II (plasma membrane and acrosomal intact), IL (intact plasma membrane and acrosomal lesions), LI (damaged plasma membrane and acrosome intact) and LL (both injured membranes). Use of this association is also possible to quantify and qualify damages caused by the process of freezing / thawing the semen of this specie. However, little correlation was observed between the staining fluorescent probes and the used of routine testing in the evaluation of canine semen, suggesting the inclusion of probes on a semen analysis protocols, since they are more accurate indicators of injury to the sperm cell.

Key words: assisted reproduction, semen analysis, cryopreservation, canids

2.1. Introdução

A técnica de congelamento do sêmen possui um importante papel na manutenção de características genéticas de interesse e incremento das taxas produtivas de diversas espécies domésticas. O sêmen congelado apresenta a conveniência de dispensar o transporte do animal, diminuindo o risco de transmissão de doenças, além do fato de se obter um maior número de doses inseminantes por ejaculado se comparado à monta natural (MASCARENHAS, 2008). Contudo, o processo de congelamento e descongelamento provoca prejuízos à integridade da célula espermática, sendo responsável pela diminuição da longevidade e capacidade fertilizante da célula. No caso do espermatozoide canino, tais danos são responsáveis pelo reduzido poder de penetração no ovócito observado após o descongelamento (ENGLAND, 1993; LINDE-FORSBERG et al., 1999; ROTA et al., 1999; THOMASSEN et al., 2006).

Durante o processo de resfriamento e congelamento, ocorrem mudanças na estrutura lipídica da membrana, o que leva à alteração de fluidez da bicamada fosfolipídica, e conseqüentemente de sua permeabilidade seletiva (WATSON, 2000). A diminuição da temperatura pode causar estresse térmico em algumas células, causando alterações irreversíveis, como diminuição ou perda da motilidade (AMAN & PICKETT, 1987; HOLT, 2000). Outro evento danoso importante é o chamado efeito solução. A partir de temperaturas menores que -5°C , tem início a formação de cristais de gelo no meio extracelular, estes alteram o potencial osmótico por diminuir a quantidade de água livre em solução. Deste modo, a célula desidrata antes de congelar, tornando o ambiente propício para lesões de membranas e organelas, causados pelos cristais (HAMMERSTEDT et al., 1990; ENGLAND, 1993; WATSON, 2000).

Neste contexto, tornou-se importante o desenvolvimento de testes que permitam quantificar danos causados pelo processo de congelamento/descongelamento. Assim, pode-se medir o grau de dano causado, permitindo a comparação da eficiência de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen.

Dentre os testes utilizados rotineiramente, destacam-se: hiposmótico (HOST), termorresistência (TTR), colorações supravitais e avaliação do grau de patologias espermáticas. Todavia, na literatura, diversos estudos apontam para a não correlação entre os resultados dos testes citados aqui como testes de rotina (KUMI-DIAKA & BADTRAM, 1994, MASCARENHAS, 2008). A avaliação do vigor e motilidade, apesar de importante, possui caráter subjetivo e está sujeita a variações relacionadas à habilidade e experiência do observador (CUNHA, 2008). SILVA (2005) relata a carência de estudos acerca destas relações em cães, pontuando a importância deste conhecimento para predição da fertilidade *in vitro* e *in vivo*. Por este motivo, testes mais específicos para a avaliação da integridade da célula espermática têm sido estudados.

As sondas fluorescentes têm se mostrado como importante ferramenta para avaliar a viabilidade de distintos compartimentos da célula espermática. Estas sondas são acurados indicadores de mudanças metabólicas na célula, devido à alteração do estado de determinadas moléculas (HAUGLAND, 2001). As sondas ligam-se a moléculas específicas sob condições específicas, e assim conjugadas passam a emitir fluorescência, se excitadas por um comprimento de onda luminosa adequado (CELEHINI, 2005).

Diversos compartimentos e organelas da célula espermática podem ser avaliados por meio do uso das sondas fluorescentes (PETERSON et al., 1974; HALANGK, 1984). O iodeto de propídio, liga-se ao DNA da célula, mas só consegue acessar o material genético se a membrana plasmática encontrar-se não funcional. Esta molécula conjugada ao DNA emite fluorescência vermelha (HARRISON & VICKERS, 1990; GRAHAM et al., 1990; MAXWELL et al., 1997; ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003). Outras sondas, como o Hoechst 33342 também têm afinidade pelo material genético, porém sendo capaz de transpor apenas a membrana plasmática intacta e funcionando assim como contra-corante do iodeto de propídio (MAXWELL et al., 1997). Outras sondas como o diacetato de carboxifluoresceína e o Hoechst 33358 também são utilizadas para avaliar a condição da membrana plasmática do espermatozoide (HARRISON & VICKERS, 1990; CASEY et al., 1993).

A membrana acrossomal também é passível de avaliação pelo emprego das sondas. O fluoróforo destas sondas, no entanto, necessita estar associado a

anticorpos ou outras moléculas como as aglutininas (CROS & MEIZEL, 1989; TOHOMAS et al., 1997; BACCETTI et al., 1999). Neste último caso, fluoresceínas como o isotiocinato de fluoresceína devem ser conjugadas com aglutininas com afinidade por glicoproteínas da membrana ou matriz acrossomal, como a *Pisum sativum* (PSA). Como exemplo desta sonda têm-se o FITC-PSA, capaz de diferenciar membranas acrossomais que sofreram ou iniciaram a reação acrossômica e membranas acrossomais intactas (HOLDEN et al., 1990; FARLIN et al., 1992).

É viável e desejável a interação de mais de um tipo de sonda, de modo a avaliar a célula espermática de modo completo, ou próximo deste (CELEGHINI, 2005). Por ser uma técnica relativamente pouco utilizada se comparada aos testes de rotina, temos como objetivo a análise de partidas de sêmen pelo uso de sondas fluorescentes e dos testes de rotina sob condições controladas, para a busca e estabelecimento de correlação entre estes testes. Neste experimento foi realizada a avaliação do sêmen canino com uso de sondas fluorescentes e testes de rotina. As sondas fluorescentes utilizadas foram o Hoechst 33342, o Iodeto de Propídio e o FITC-PSA. Os demais testes aplicados foram: HOST, patologia espermática, vigor e motilidade. As amostras de sêmen utilizadas foram submetidas às análises tanto a fresco como quando descongeladas.

Conforme pesquisa bibliográfica, esta associação ainda não foi testada para o cão doméstico. A maioria dos trabalhos envolvendo sondas fluorescentes para avaliação do sêmen desta espécie usa o iodeto de propídio e a carboxifluoresceína para a avaliação da integridade da membrana plasmática (CUNHA & LOPES, 2005; CHIRINÉA et al., 2006; CHIRINÉA, 2008; CUNHA, 2008; NEVES et al., 2009).

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Animal experimental

Foi utilizado um cão macho adulto de 8,5 anos e 26 kg, da raça Pitbull, mantido por proprietário particular. O animal se mostrou hígido durante o período experimental. O cão utilizado demonstrou boa qualidade seminal e bons resultados pós descongelamento em testes piloto, além de possuir fertilidade comprovada *in vivo*.

2.2.2. Protocolo de manipulação do sêmen

A segunda fração do ejaculado foi coletada por manipulação peniana em tubo tipo falcon. O sêmen foi homogeneizado com o auxílio de uma micropipeta e uma alíquota de 20 µL retirada para cálculo da concentração espermática em câmara de Neubauer. Uma alíquota de 10 µL destinada à análise de vigor e motilidade, uma de 20 µL para realização do teste hiposmótico (HOST) e finalmente uma de 100 µL para análise das patologias espermáticas.

Após aferida a concentração, esta foi padronizada para 100×10^6 espermatozoides/mL por diluição em meio TRIS-Citrato com gema de ovo sem a adição de glicerol.

Uma alíquota de 1 mL do ejaculado teve seu volume dobrado por adição na proporção de 1:1 v/v de meio TRIS-Citrato acrescido de gema de ovo e com concentração de 12% de glicerol e 1% de Equex STM Paste®. Assim obteve-se uma concentração espermática final de 50×10^6 espermatozoide/mL e 6% de glicerol e 0,5% de Equex STM Paste®. O volume final foi envasado em palhetas francesas de 0,25 mL. As palhetas foram resfriadas por duas horas em tubo de ensaio envolto por água a 38 °C, e este envolto por gelo e água na altura de 13 cm, dentro de caixa isotérmica fechada. Nestas condições a temperatura caiu de 38 °C para 4 °C em uma hora (0,56 °C/min). Após esta etapa, foi feito tempo de equilíbrio de uma hora, onde o sêmen permaneceu a 4 °C, ainda dentro da caixa isotérmica. Logo após, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido. Utilizou-se lâmina de

nitrogênio líquido de 3 cm, sobre esta lâmina foi colocada uma bóia onde as palhetas permaneciam a uma altura de 10 cm. Após 15 minutos as palhetas foram mergulhadas na lâmina de nitrogênio líquido e acondicionadas em botijão de criopreservação, conforme MASCARENHAS (2008). Após 24 horas, a alíquota congelada foi descongelada durante 7 segundos a 37 °C e submetida às mesmas análises citadas para o sêmen fresco.

O restante da partida de sêmen foi dividido em duas alíquotas. Metade do volume obtido foi mantido em banho Maria a 38 °C e a outra amostra, foi submersa em nitrogênio líquido e posteriormente reaquecida a 38 °C por três vezes consecutivas, matando as células por choque térmico, conforme Strom Holst (2000) modificado. As células lesionadas pelo choque térmico foram utilizadas como controle positivo. Após este processo, um alíquota foi analisada em microscópio para certificação de que não haviam células funcionais. Com estas duas partidas, foi realizada imediatamente a incubação a 38 °C com as sondas fluorescentes. Em 40 µL de sêmen, foram adicionados 4 µL de Iodeto de Propídio, 40 µL de Hoechst 33342 e 100 µL de FITC-PSA, sendo incubados assim por 20 min. conforme Celeghini (2005), modificado. Após 24 horas, a alíquota congelada foi descongelada durante 7 segundos a 38 °C e submetida às mesmas análises citadas para a amostra de sêmen fresco com as sondas fluorescentes.

Para a correção das concentrações de 100×10^6 e 50×10^6 espermatozoides/mL, para espermatozóides móveis/mL, multiplicou-se a concentração calculada em câmara de Neubauer pela motilidade.

2.2.3. Análises microscópicas

- Vigor e motilidade espermática: Os parâmetros foram avaliados a partir de uma gota de sêmen diluído entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C e observado em microscópio de luz (Olimpus). Os valores do vigor (intensidade de movimento) foram estabelecidos entre 0 e 5 e a motilidade espermática retilínea progressiva entre 0 e 100%, conforme as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Foi utilizado aumento de 400 vezes.

- Morfologia: Uma alíquota de sêmen foi adicionada em fixador Karnovsky até turvar a mistura. Posteriormente foram feitas lâminas pelo método de câmara úmida onde foram contabilizadas 200 células com o uso de microscópio de contraste de fase (Nikon). No caso da ocorrência de duas patologias em uma célula, foi considerada apenas a patologia mais grave. Os defeitos espermáticos foram subdivididos em maiores e menores conforme CBRA (1998).

- Teste hiposmótico (HOST): Uma alíquota de 20 µL de sêmen foi adicionada a 250 µL de solução hiposmótica de sacarose, a 150 mOsmol/Kg. Após 30 min de incubação a 37 °C foi adicionado 0,5 mL do fixador Karnovsky. Foram contadas 200 células no aumento de 1000 vezes, sendo o resultado expresso em porcentagem. A contagem foi realizada em microscópio de contraste (Nikon) de fase em preparação úmida. As células com cauda dobrada ou fortemente dobrada e cauda enrolada ou fortemente enrolada foram consideradas reativas ao teste hiposmótico. Para correção dos valores, a porcentagem destas patologias encontradas na análise morfológica foram subtraídas do resultado do respectivo hiposmótico.

- Sondas fluorescentes: Após o protocolo de incubação descrito, uma gota do sêmen foi depositada entre lâmina e lamínula pré aquecida e avaliada em microscópio de epifluorescência (Nikon) equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm) nos aumentos de 400 e 1000 vezes. Foram contabilizadas 100 células por análise. Os resultados foram expressos em percentual de células coradas. Fez-se a leitura de duas amostras para o sêmen a fresco e duas para o descongelado, obtendo-se a média entre as amostras.

- Controle positivo: uma alíquota de 40 µL de sêmen foi submersa três vezes em nitrogênio líquido seguidas de reaquecimento em banho Maria a 37 °C. Após este procedimento a amostra foi incubada com as sondas iodeto de propídio e Hoechst 33342 e analisada em microscópio de epifluorescência para avaliação do grau de lesão das membranas, conforme protocolo descrito.

2.2.4. Análise estatística

O comportamento das variáveis entre tratamentos foi submetido a análise pelo teste de Lillifors, para verificação de distribuição normal ou não das variáveis. Também foi analisado pelos testes de Cochran e Bartlett, para verificação da homogeneidade das variâncias.

Para comparação das médias dos dados obtidos na análise de sêmen entre os tratamentos congelado e descongelado foi utilizado o teste F a 5% de significância, quando estas preencheram as premissas para realização de análise paramétrica. As variáveis que não permitiram a análise paramétrica foram analisadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, também a 5% de significância.

As correlações entre e dentre as características avaliadas nos tratamentos sêmen fresco e descongelado foram obtidas por Correlação Simples de Pearson a 5% de significância.

Foram realizadas cinco repetições, onde o sêmen coletado foi avaliado a fresco e após o descongelamento. Foram considerados como tratamentos o sêmen a fresco e o descongelado. Todas as análises foram realizadas com uso do software SAEG 9.1 (2007).

2.3. Resultados e Discussão

A opção de usar apenas um animal se deu pelo fato da grande variação individual dos cães na resposta do sêmen ao processo de congelamento/descongelamento (CHIRINÉA, 2008; MASCARENHAS, 2008). Assim, buscou-se retirar o efeito macho.

Com o uso das sondas fluorescentes foi possível distinguir quatro populações nos ejaculados analisados (Tab. 1).

Tabela 1 – Populações de espermatozoides isoladas pela associação das sondas IP, H342 e FITC-PSA

Populações	H 342	IP	FITC-PSA
<i>Membrana plasmática e membrana acrossomal íntegras (II)</i>	+	-	-
<i>Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada (IL)</i>	+	-	+
<i>Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal íntegra (LI)</i>	-	+	-
<i>Membrana plasmática e membrana acrossomal lesadas (LL)</i>	-	+	+

H 342: Hoechst 33342 / IP: Iodeto de Propídio / FITC-PSA: Isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Pisum sativum*

A partir da variação observada entre as proporções destas populações, a associação das sondas também permitiu quantificar e qualificar danos específicos causados pelo processo de congelamento/descongelamento. Danos estruturais e perda de funcionalidade da membrana plasmática e acrossomal, e a ocorrência precoce da reação acrossômica puderam ser quantificados pela associação de sondas testadas. Esta associação de sondas fluorescentes também se mostrou capaz de distinguir as mesmas subpopulações no sêmen de bovinos (CELEGHINI, 2005).

Os espermatozoides com ambas as membranas íntegras, apresentaram o núcleo corado de azul pela sonda Hoechst 33342. As células com membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada tiveram o núcleo corado de azul e a região correspondente ao capuz acrossomal emitindo fluorescência verde/amarela, associada à sonda FITC-PSA. Os espermatozoides com membrana plasmática lesada

e acrossomal íntegra tiveram o núcleo corado de vermelho pelo iodeto de propídio e os com ambas as membranas lesadas, o núcleo em vermelho e acrossoma em verde/amarelo (Fig. 1).



Figura 1 – Populações de espermatozoides distintas em ejaculado de cão doméstico pela associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio, Hoechst 33342 e FITC-PSA

II: ambas as membranas íntegras / IL: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada / LI: membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra / LL: ambas as membranas lesionadas

A diferença das médias entre os tratamentos a fresco e descongelado foram avaliadas pelo teste F a 5% de significância. Apenas as variáveis Defeitos Menores e População IL não apresentaram distribuição paramétrica, sendo por este motivo analisadas pelo teste de Wilcoxon a 5% de significância. Neste estudo, os resultados

de todos os testes foram significativos para identificar danos causados à célula espermática pelo processo de congelamento/descongelamento (Tab. 2).

Tabela 2 – Médias dos parâmetros avaliados seguidos do desvio padrão e coeficiente de variação entre os tratamentos a fresco e descongelado

	A Fresco	CV A Fresco	Descongelado	CV Descongelado
Vigor	4,6 0± 0,22 ^a	4,86	2,60 ± 0,41 ^b	16,08
Motilidade %	95,00 ± 0,00 ^a	-	34,20 ± 20,32 ^b	59,43
Patologias %	24,00 ± 8,86 ^a	36,91	44,00 ± 10,68 ^b	24,27
DM %	21,00 ± 1,87 ^a	8,90	64,40 ± 25,55 ^b	39,68
Dm %*	26,80 ± 16,33 ^a	60,93	23,60 ± 18,83 ^b	79,81
HOST %	77,80 ± 10,01 ^a	12,86	47,30 ± 15,92 ^b	33,65
II %	68,46 ± 7,13 ^a	10,42	8,80 ± 10,08 ^b	114,59
IL %*	0,06 ± 0,14 ^a	223,60	5,50 ± 9,84 ^b	179,07
LI %	25,86 ± 6,88 ^a	26,61	39,40 ± 24,74 ^b	62,80
LL %	8,00 ± 6,59 ^a	82,44	53,90 ± 16,18 ^b	30,03
FITC-PSA	8,06 ± 6,57 ^a	81,56	59,40 ± 16,51 ^b	27,80

Os valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste F a 5% de significância

* Variáveis analisadas pelo teste de Wilcoxon a 5% de significância. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente.

CV: Coeficiente de Variação / DM: Defeitos Maiores / Dm: Defeitos menores / HOST: teste hiposmótico / II: ambas as membranas íntegras / IL: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada / LI: membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra / LL: ambas as membranas lesionadas / FITC-PSA: Isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Psium sativum*.

O vigor e motilidade espermática são características avaliadas subjetivamente, e por isto mais sujeitas a variações entre observadores, sendo assim de difícil comparação entre estudos (CUNHA, 2008). São sabidamente afetadas negativamente no processo de criopreservação (HOLT, 2000; MASCARENHAS, 2008; CARDOSO, 2005; EILTS, 2005). Neste estudo houve queda ($p < 0,05$) em ambos os parâmetros, contudo a ausência de motilidade não implica em um espermatozóide morto (CASEY et al., 1993; JANUSKAUSKAS et al., 1996). Células

imóveis podem retornar à motilidade se estimuladas com substâncias como a cafeína, por exemplo (LARSSON et al., 1976). De qualquer modo, embora sejam conflitantes as relações entre motilidade e fertilidade *in vivo*, este parâmetro é largamente utilizado, dado sua praticidade e por ser um bom indicador da integridade e funcionalidade celular (TARDIF et al., 1999), fator indispensável para que ocorra a fecundação (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Deste modo, estes parâmetros devem ser associados a outros testes mais específicos, objetivos e complementares, no intuito de melhor predizer a qualidade do ejaculado.

A morfologia espermática sofreu aumento das patologias totais ($p < 0,05$) do sêmen fresco para o descongelado. Segundo Otlé (1993), o grau de patologia espermática apresenta boa correlação com a fertilidade. Em seu estudo, ejaculados com grau de patologias menor que 60% apresentaram taxa de fertilidade de 61%, ao passo que ejaculados com grau maior que 60% apresentaram apenas 13% de fertilidade. Contudo, os resultados de fertilidade *in vivo* sofrem viés de variáveis da fêmea, como idade, nível nutricional, e qualidade ovocitária, por exemplo (ROTA et al., 1999; SANTOS, 2009), o que prejudica sobremaneira a interpretação dos resultados, particularmente quando se utiliza um reduzido número de fêmeas. De forma geral ainda não está evidenciada a relação entre patologia e fertilidade (CARDOSO, 2005).

Neste estudo a patologia total foi dividida em defeitos maiores e menores, e ambos apresentaram aumento ($p < 0,05$) do tratamento a fresco para o descongelado. Os defeitos menores são defeitos que, embora possam causar infertilidade, não estão especificamente associados a estas, ou a condições patológicas testiculares ou epididimárias (BLOM, 1972). No presente experimento após o processo de congelamento/descongelamento houve aumento significativo apenas de determinadas patologias, em especial cauda fortemente dobrada, considerada como defeito maior pelo CBRA (1998). A cauda fortemente dobrada em touros, segundo Blom (1972), é um defeito associado ao trânsito epididimário, e de origem genética. Contudo, neste estudo mostrou-se associada ao processo de congelamento/descongelamento. Sendo assim, as demais patologias, incluindo todos os defeitos menores não contribuíram significativamente na qualificação final

do sêmen. Neste estudo, a maioria dos defeitos menores foi devido ao dobramento de cauda.

O teste hiposmótico é utilizado para verificar a funcionalidade e integridade da membrana plasmática. O espermatozóide exposto a um meio hiposmótico, responde ao meio ganhando água, o que resulta em enrolamento e curvamento de cauda (ENGLAND & PLUMMER, 1993). Neste estudo houve diminuição ($p < 0,05$) do número de células reativas ao meio hiposmótico do tratamento fresco para o descongelado. Durante o processo de congelamento/descongelamento ocorre desestabilização da bicamada fosfolipídica que compõe a membrana plasmática (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Em algumas células, os danos causados neste sentido podem ser irreversíveis (AMMAN & PICKETT, 1987; HOLT, 2000). O meio hiposmótico utilizado foi sensível ao aumento de danos de membrana plasmática causados pelo protocolo de congelamento/descongelamento. Outros autores, utilizando composições diferentes, também obtiveram resultados positivos (SILVA, 2005; ROTA et al., 2006; MASCARENHAS, 2008). Os diferentes meios utilizados, bem como diferentes tempos de incubação, inviabilizam a comparação de resultados.

A população IL foi composta por um número extremamente reduzido de células, porém aumentou ($p < 0,05$), do sêmen fresco para o sêmen descongelado. A associação entre membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada foi uma combinação rara de ser observada, uma vez que a membrana acrossomal de alguma forma é protegida pela presença de uma membrana plasmática íntegra. A reação acrossômica depende de uma prévia desestabilização da membrana plasmática, que permite o influxo de substâncias que contribuem para a ocorrência da reação (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A população II decaiu do sêmen a fresco para o descongelado, ao passo que a população LL aumentou ($p < 0,05$). Este resultado mostra sensibilidade das sondas para detectar alterações deletérias do processo de congelamento/descongelamento nas membranas plasmáticas e acrossomais. Celeghini (2005), utilizando dois protocolos distintos de congelamento, usou sondas fluorescentes em bovinos para verificar a integridade de membranas e também encontrou resultados significativos entre os tratamentos fresco e descongelado. No referido estudo houve aumento de membranas lesionadas e conseqüente

diminuição das íntegras. Em sêmen de carneiros, o uso das sondas iodeto de propídio e FITC-PSA foi eficaz também para medir danos causados nas membranas pelo congelamento (CELEGHINI et al., 2010). Em cães, o iodeto de propídio já havia se mostrado útil para apontar lesões de membrana plasmática causadas pela criopreservação, contudo este não foi utilizado associado ao Höchst 33342 (PEÑA et al., 1999; DORADO et al., 2010).

Os resultados obtidos com a sonda FITC-PSA mostraram um grande aumento de membranas acrossômicas lesadas no sêmen descongelado em relação ao sêmen a fresco. Esta lesão pode na verdade ser devido ao processo conhecido como criocapacitação. Este termo foi usado por CORMIER & BAILEY (2003) para descrever as alterações causadas pelo processo de congelamento/descongelamento à membrana acrossomal de bovinos. Neste processo há ainda uma desestabilização da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática, o que permite um aumento do influxo de cálcio na célula espermática, aumentando assim sua atividade. Outro efeito desta desestabilização é a criação de um ambiente favorável para o início da reação acrossômica (HAFEZ & HAFEZ, 2004). O processo de indução à capacitação espermática precoce devido à criopreservação em cães é relatado por ROTA et al., (1999).

Buscou-se a correlação das variáveis dentro dos tratamentos a fresco, descongelado e entre estes tratamentos com o uso da Correlação Simples de Pearson.

no sêmen a fresco A patologia total foi correlacionada positivamente com os defeitos menores, e negativamente com os resultados do teste hiposmótico, da mesma forma que os defeitos menores também correlacionaram-se negativamente com os resultados do teste hiposmótico ($p < 0,05$). Com base nestes resultados os defeitos menores foram as patologias predominantes no sêmen fresco, assim, pode se sugerir que, seriam associadas aos danos de membrana plasmática. Dentre os defeitos menores, o mais observado nas amostras analisadas foi a cauda dobrada. Nesta pesquisa, o hiposmótico em cães não foi correlacionado com a motilidade, o que aconteceu em outros estudos, (KUMI-DIAKA, 1993; RODRIGUEZ-GIL et al, 1994; PINTO & KOZINK, 2007).

Ainda no sêmen fresco, a população II mostrou correlação negativa com a população LL ($p < 0,05$). Estes dados refletem a especificidade e comportamento satisfatório da combinação de sondas fluorescentes testadas. Segundo Hafez & Hafez (2004) a integridade da membrana plasmática previne a reação acrossômica, deste modo, em um ejaculado com predomínio de células com membrana plasmática íntegra, espera-se um reduzido número de membranas acrossomais reagidas. A mudança de conformação da membrana plasmática favorece o influxo de íons cálcio, aumentando a atividade celular e criando ambiente propício para a reação acrossômica (CORMIER & BAILEY, 2003; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Embora o teste HOST seja uma aferição da integridade de membrana plasmática, nenhuma correlação foi observada com as populações coradas como íntegras pelas sondas fluorescentes.

Já nas amostras de sêmen descongeladas, vigor e motilidade correlacionaram-se positivamente ($p < 0,05$). A correlação entre vigor e motilidade com a fertilidade existe devido ao fato destes parâmetros estarem de certa forma associados à integridade celular (OTTLÉ, 1993, PENÃ-MARTINEZ, 2004). Contudo, outras variáveis contribuem para que tal relação não seja bem esclarecida (EILTS, 2005).

No sêmen descongelado os defeitos maiores tiveram correlação positiva com a população LL ($p < 0,05$), sendo que o defeito maior mais encontrado no sêmen descongelado foi a cauda fortemente dobrada. Esta correlação permite supor que, existe uma associação direta entre a lesão de membrana plasmática e a presença de defeitos maiores. Esta mesma correlação não foi observada no sêmen fresco, o que nos permite supor que o protocolo de congelamento favoreceu o surgimento de defeitos maiores em relação direta ao aumento da população de células com membrana plasmáticas lesadas. Conforme o CBRA (1998), estas patologias estão associadas a evidente diminuição do potencial de fertilização da célula. Em estudo com sêmen descongelado, a combinação de sondas iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína, também demonstrou associação com a morfologia espermática (NEVES et al., 2009).

Ainda para o tratamento descongelado, os resultados do teste hiposmótico correlacionaram-se positivamente com a população II ($p < 0,05$). Ou seja, o teste

hiposmótico apresenta real valor preditivo na detecção da integridade de membrana plasmática no sêmen descongelado. Neves (2009), trabalhando com sêmen canino descongelado, também obteve correlação semelhante, embora com o uso de diacetato de carboxifluoresceína.

A patologia total do sêmen descongelado correlacionou-se positivamente com a patologia e os defeitos menores do sêmen fresco. Os defeitos menores diminuíram ($p < 0,05$) no tratamento fresco em relação ao descongelado, enquanto os maiores aumentaram ($p < 0,05$). O defeito mais presente no sêmen a fresco foi a cauda dobrada ao passo que no descongelado foi a cauda fortemente dobrada. Possivelmente, células apresentando o defeito menor cauda dobrada, no sêmen fresco, evoluiu para o defeito maior cauda fortemente dobrada durante o processo de congelamento. Farstad (1996) nomeia este tipo de defeito como secundário, por estar associado ao processo de manipulação, congelamento e descongelamento.

2.4. Conclusão

A associação das sondas fluorescentes Iodeto de Propídio, Hoechst 33342 e FITC-PSA mostrou-se eficaz para distinguir diferentes populações de espermatozoides em ejaculados de cão doméstico. Neste trabalho o Hoechst 33342 mostrou-se eficiente no papel de contra corante do Iodeto de Propídio. A utilização desta associação também permitiu quantificar e qualificar danos causados pelo processo de congelamento/descongelamento no sêmen desta espécie. Porém, pouca correlação foi observada entre a coloração por sondas fluorescentes e os testes de rotina utilizados na avaliação do sêmen canino, o que sugere a inclusão das sondas nos protocolos de análise de sêmen, uma vez que são indicadores mais precisos de injúrias à célula espermática.

2.5. Referências Bibliográficas

AMANN, R. P. & PICKETT, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallionspermatozoa. *Equine Veterinary Science*, 7, 145-173.

ARRUDA, R. P. (2000). *Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)*. Tese de Livre Docência, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo,. 121 p.

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. (2003a). Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31(Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, 226-227.

BACCETTI, B.; GAMBERA, L.; MORETTI, E.; PIOMBONI, P. (1999). A quick molecular method for simultaneous detection in spermatozoa of nuclear, acrosomal and axonemalstructure by fluorescent microscopy. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology*, v. 31(4), 563-569.

BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. (1998). A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. *Biology of Reproduction*, 58, 686-699.

BLOM E. (1972). The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: *Atti del VII SIMPOSIO INT DI ZOOTECHNIA MILAN, 7., Milan*. Proceedings. Milan: 1972. p.125-139.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. da. (2005). Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, 29(3/4), 179-187.

CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M.; DROBINS, E. Z. (1993). Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *Journal of Andrology*, 14(4), 289-297.

CASTILHO, E. F. (2008). *Uso da própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino*. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Viçosa, MG., 57 p.

CBRA, 1998. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte: 54p.

CELEGHINI, E. C. C. (2005). *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). USP, Pirassununga-SP.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. (2010). Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62(3), 536-543.

CHIRINÉA, V. H.; MARTINS, M. I. M.; SOUZA, F. F. de; TEBET, J. M.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D. (2006). Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. *Ciência Animal Brasileira*, 7(4), 407-415.

CHIRINÉA, V. H. (2008). *Inseminação artificial com sêmen congelado em cães*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu-SP, 85 p.

CORMIER, N. & BAILEY J. L. (2003). A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation. *Biol Reprod*, 69, 177-185.

CROSS, N. L. & MEIZEL, S. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction*, 41, 635-641.

CUNHA, I. C. N. da; & LOPES, M. D. (2005). Efeito de três diferentes diluidores sobre o sêmen canino submetido a dois protocolos de descongelamento. *Braz J vet Res anim Sci*, 42(5), 372-380.

CUNHA, I. C. N. da (2008). Exame andrológico do cão. *JBCA – Jornal Brasileiro de Ciência Animal*. 1(1), 40-65.

DORADO, J.; GÁLVEZ, M. J.; MURABITO, M. R.; DEMYDA, S.; MORENO, M.; HIDALGO, M. (2010). Canine Sperm Simultaneous Fluorometric Assessment of Plasma and Mitochondrial Membranes. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 67(1), 365-.

EILTS, B.E. (2005). Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, 64, 685-691.

ENGLAND, G. C. (1993). Criopreservação de dog sêmen: a review. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 47, 234-255.

ENGLAND, G. C. W. & PLUMMER J. M. (1993). Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 47(Suppl), 261-270.

FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. (1992). Assessment of *Psium sativum* agglutinin identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 32, 23-27.

FARSTAD, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 251-260.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; MAMMERSTEDT, R. H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrossomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 43, 55-64.

HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. (2004). *Reprodução Animal*. 7ª ed. Barueri, SP: Manole,. 513 p.

HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNEENSACK, R. (1984). Zur bestimmungder menge intakter spermien in bullenejakulaten. *Archiev. Exper. Vet. med., Leipzig*, 38(1), 105-114.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Andrology*,. 11(1), 73-87.

HARRISON, R. A. P. & VICKERS, S. E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88, 343-352.

HAUGLAND, R. P. (2001). *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Molecular probes.

HOLDEN, C. A.; ROSS, V. H.; SATHANANTHAN, A. H.; TROUNSON, A. O. (1990). Assessment of the human sperm acrosomereaction using caoncavalian A lectin. *Molecular Reproduction and Development*, 25, 247-257.

HOLT, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 3-22.

JANUSKAUSKAS A, HAARD MG, HAARD MCH, SÖDERQUIST L, LUNDEHEIM N, RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1996). Estimation of sperm viability in frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *J Vet Med Assoc*, 43, 281-287.

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

KUMI-DIAKA, J. & BADTRAM, G. (1994). Effects of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: *in vitro* bioassay for canine semen. *Theriogenology*, 41, 1355-1366.

LARSSON K, EINARSOON S, NICANDER L. (1976). Influence of thawing diluents on viability, acrossome morphology, ultrastructure and enzyme release of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand*, 17, 83-100.

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

MASCARENHAS, R. M. (2008). *Avaliação individual e racial da qualidade do sêmen canino in natura e criopreservado em diferentes protocolos*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa-MG.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. (1997). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction of Fertility and Development*, 8, 1165-1178.

NEVES, M. M.; HENRY, M.; CLEMENTE, C. A. A.; HENEINE, L. G. D. (2009). Padronização de uma técnica de congelamento de sêmen em cães. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(3), 259-263.

OETTLÉ, E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil*, 47, 257-260.

PEÑA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. (1999). Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 52, 965-980.

PEÑA-MARTINEZ, A. I. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Repro. Sci.*, 82-83, 209-224.

PETERSON, R. N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. (1974). A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 41, 485-488.

PINTO, C. R. F. & KOZINK D. M. (2007). Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, doi: 10, 1016.2007.07.005.

RODRIGUEZ-GIL, J. E.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; KRUIF, A. (1994). Effects of hypoosmotic test incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa.

ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P.; LINDE-FORSBERG, C. (1999). Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, 51, 1045-1058.

ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. et al. (2006). Comparison between glycerol and ethyleneglycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, 65, 1848-1858.

SANTOS, M. C. R. (2009). *Avaliação de métodos alternativos para análises da capacidade de ligação do espermatozoide caprino e estudo do polimorfismo no gene Izumo em caprino, devido à ação do congelamento do sêmen*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa-MG.

SILVA, A. R. (2005). *Criopreservação Do Sêmen Canino Diluído Em Tris: Avaliação Morfológica, Funcional E De Suas Interações Com Ovócitos Homólogos*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE.

TARDIF, S.; LAFOREST, J. P.; CORMIER, N.; BAILEY, J. L. (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, 52, 447-459.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHAL, C. E. (1997). Fluorometric assessments of acrossomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 56, 991-998.

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

WATSON, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Repro. Sci.* 60-61, 481-492.

3. Uso do ensaio de ligação do espermatozoide do cão *Canis lupus familiaris* à membrana perivitelina do ovo de galinha *Gallus gallus* como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen

Resumo

Ensaio de ligação utilizando ovócitos homólogos podem ser realizados para avaliar o grau de impacto negativo de protocolos de congelamento/descongelamento sobre a capacidade de ligação do espermatozoide. Em diversas espécies domésticas os testes com ovócitos podem ser substituídos pelo uso da membrana perivitelina da gema do ovo de galinhas, dada a similaridade estrutural entre a proteína responsável pela ligação – ZP3 – em diferentes espécies estudadas. Neste estudo o sêmen de cão a fresco e descongelado foi incubado sob condições controladas com fragmentos de membrana perivitelina da gema do ovo de galinha (MPV) para testá-la como substrato de ligação. Foi observada diferença na quantidade de ligações observadas no sêmen fresco em relação ao sêmen descongelado ($p < 0,05$). O número de células ligadas coradas pelo iodeto de propídio aumentou entre os tratamentos a fresco e descongelado, ao passo que as células ligadas coradas pelo Hoechst 33342 diminuíram ($p < 0,05$). Apenas o teste hiposmótico apresentou correlação positiva ($p < 0,05$) entre a qualidade do sêmen fresco e o número de espermatozoides ligados à MPV após o descongelamento. O comportamento da membrana perivitelina e das sondas entre os tratamentos mostrou sensibilidade da membrana em distinguir sêmens de diferentes potenciais de ligação ($p < 0,05$).

Palavras chave: reprodução assistida, criopreservação, sêmen, canídeos

Abstract

Binding assays using homologous oocytes can be performed to evaluate the degree of negative impact on protocols of freezing / thawing on the binding capacity of sperm. In tests with several domestic species oocytes can be replaced by the use of the perivitelline layer of the egg yolk from hens given the structural similarity between the protein responsible for binding - ZP3 - in different species. In this study, fresh dog semen was thawed and incubated under controlled conditions with perivitelline layer fragments from chicken egg yolk and we observed differences in the amount of connections observed in fresh semen compared to frozen-thawed semen ($p < 0,05$). If in one hand the number of propidium iodide stained cells increased from fresh to unfrozen treatment, on the other hand, Hoechst 33342 stained cells decreased. Only the hypoosmotic test showed a positive correlation ($p < 0,05$) between the quality of fresh semen and the number of bound sperm to the perivitelline layer after thawing. The behavior of probe and perivitelline layer between treatments showed that the membrane is sensitive to distinguish semen of different potential binding ($p < 0.05$).

Key words: assisted reproduction, cryopreservation, semen, canids

3.1. Introdução

Os protocolos de congelamento de sêmen desenvolvidos para o cão doméstico, embora alvo de inúmeros estudos e experimentações, ainda não são totalmente consolidados e geram um elevado grau de dano à célula espermática. Estes danos, em sua maioria, ocorrem devido à variação da temperatura, em especial ligados a eventos como o choque frio e o efeito solução (HOLT, 2000; WATSON, 2000; PESCH & BERGMENN, 2006). Os testes utilizados na rotina de avaliações de sêmen a fresco e pós descongelamento são: o hiposmótico (HOST), as colorações supra vitais, o teste de termorresistência (TTR), a avaliação morfológica e, principalmente, as avaliações de vigor e motilidade. Muitas vezes estes testes não podem ser correlacionados entre tratamentos. As análises de vigor e motilidade, embora mais fáceis de serem obtidas e interpretadas, possuem caráter subjetivo, uma vez que são interpretações diretas sobre a visualização de uma amostra (MASCARENHAS, 2008, CUNHA, 2008).

As relações entre os resultados destes testes de rotina ainda são pouco desvendadas, o que prejudica sua interpretação (HERRERA et al., 2004). Apesar dos resultados dos testes citados serem úteis para inferir sobre a qualidade do sêmen, estes não predizem com confiabilidade a sua capacidade fertilizante, um dos eventos cruciais para que ocorra a fecundação. Muitas vezes a manutenção da motilidade não implica em integridade celular (VARNER et al., 1988) e, segundo alguns estudos, não possuem correlação confiável com a fertilidade (PACE & SULLIVAN, 1975). De um modo geral, o vigor, a motilidade e a morfologia espermática oferecem limitações à predição da capacidade fertilizante do espermatozoide (KUMI-DIACA, 1993; CORREA & ZAVOS, 1994). Contudo, embora apontado como subjetivo e sujeito a variações dependentes do observador, os valores de vigor e motilidade espermáticos representam bons indicadores da qualidade do sêmen (THOMASSEN et al., 2006).

Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de testes que permitam inferir sobre a capacidade de ligação do espermatozoide à glicoproteínas que compõem a zona pelúcida do ovócito, mais especificamente à ZP3. A utilização deste tipo de teste orienta o desenvolvimento de protocolos de

congelamento/descongelamento que causem menor dano celular e consequentemente da capacidade fertilizante do espermatozóide. Estudos neste sentido foram realizados por meio de ensaios de ligação entre espermatozoides de cão e ovócitos homólogos *in vitro* (SILVA, 2005, de los REYES, 2009).

Todavia, este tipo de experimentação apresenta algumas dificuldades. A obtenção dos ovócitos, por exemplo, depende de procedimentos cirúrgicos, que acarretam gastos, e a fertilidade da fêmea e status metabólico dos ovócitos podem gerar viés de interpretação (ROTA et al., 1999; TARDIF et al., 1999; EILTS, 2005; SANTOS, 2009). Diante deste cenário e da importância da realização de testes de capacidade de ligação, pesquisas têm sido conduzidas na busca por substratos mais uniformes e mais viáveis economicamente.

A membrana perivitelina da gema do ovo de galinha (MPV) parece ser uma boa opção uma vez que apresenta correspondência estrutural à zona pelúcida do ovócito mamífero. Pesquisas mostraram que a MPV permitiu diferenciação da capacidade de ligação do sêmen de galos com fertilidade sabidamente distinta (BARBATO et al., 1998). Esta correspondência estrutural refere-se, em especial, à presença da glicoproteína ZP3, que é a principal responsável pela ligação do espermatozoide à superfície do ovócito (HAFEZ & HAFEZ, 2004). O sequenciamento de aminoácidos da ZP3 é muito semelhante entre as espécies estudadas. Neste sentido, alguns testes realizados com mamíferos mostraram ser a membrana perivitelina do ovo de galinha um substrato capaz de responder diferentemente a ejaculados de qualidades distintas (AMORIM, 2008; SANTOS, 2009; dos REIS et al., 2003). A vantagem do uso da MPV está principalmente em sua fácil obtenção (AMORIM, 2008) e na diminuição do efeito fêmea, uma vez que partidas de sêmen diferentes podem ser desafiadas sobre fragmentos de uma mesma membrana.

Neste experimento o objetivo foi validar a membrana perivitelina da gema de ovo de galinha como substrato para a avaliação da capacidade de ligação do sêmen de cão doméstico.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Animal Experimental

Foi utilizado um cão macho adulto de 8,5 anos e 26 kg, da raça Pitbull, mantido por proprietário particular. O animal se mostrou hígido durante o período experimental. O cão utilizado demonstrou boa qualidade seminal e bons resultados pós descongelamento em testes piloto, além de possuir fertilidade comprovada *in vivo*.

3.2.2. Protocolo de coleta e manipulação do sêmen

A segunda fração do ejaculado foi coletada por manipulação peniana em tubo tipo falcon. O sêmen foi homogeneizado com o auxílio de uma micropipeta e uma alíquota de 20 µL foi retirada para cálculo da concentração espermática em câmara de Neubauer. Uma alíquota de 10 µL destinada à análise de vigor e motilidade, uma de 20 µL para realização do teste hiposmótico (HOST) e finalmente uma de 100 µL para análise das patologias espermáticas.

Após aferida a concentração, esta foi padronizada para 100×10^6 espermatozoides/mL por diluição em meio TRIS-Citrato com gema de ovo sem a adição de glicerol.

Uma alíquota de 1 mL do ejaculado teve seu volume dobrado por adição na proporção de 1:1 v/v de meio TRIS-Citrato acrescido de gema de ovo e com concentração de 12% de glicerol e 1% de Equex STM Paste®. Assim obteve-se uma concentração espermática final de 50×10^6 espermatozoide/mL e 6% de glicerol e 0,5% de Equex STM Paste®. O volume final foi envasado em palhetas francesas de 0,25 mL. As palhetas foram resfriadas por duas horas em tubo de ensaio envolto por água a 38 °C, e este envolto por gelo e água na altura de 13 cm, dentro de caixa isotérmica fechada. Nestas condições a temperatura caiu de 38 °C para 4 °C em uma hora (0,56 °C/min). Após esta etapa, foi feito tempo de equilíbrio de uma hora, onde o sêmen permaneceu a 4 °C, ainda dentro da caixa isotérmica. Logo após, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido. Utilizou-se lâmnina de

nitrogênio líquido de 3 cm, sobre esta lâmina foi colocada uma bóia onde as palhetas permaneciam a uma altura de 10 cm. Após 15 minutos as palhetas foram mergulhadas na lâmina de nitrogênio líquido e acondicionadas em botijão de criopreservação, conforme MASCARENHAS (2008). Após 24 horas, a alíquota congelada foi descongelada durante 7 segundos a 37 °C e submetida às mesmas análises citadas para o sêmen fresco.

O restante da partida de sêmen foi dividido em duas alíquotas. Metade do volume obtido foi mantido em banho Maria a 38 °C e a outra amostra, foi submersa em nitrogênio líquido e posteriormente reaquescida a 38 °C por três vezes consecutivas, matando as células por choque térmico, conforme Ström Holst (2000) modificado. As células lesionadas pelo choque térmico foram utilizadas como controle positivo. Após este processo, um alíquota foi analisada em microscópio para certificação de que não haviam células funcionais. Com estas duas partidas, foi realizada imediatamente a incubação a 38 °C com as sondas fluorescentes. Em 40 µL de sêmen, foram adicionados 4 µL de Iodeto de Propídio, 40 µL de Hoechst 33342 e 100 µL de FITC-PSA, sendo incubados assim por 20 min. conforme Celeghini (2005), modificado. Após 24 horas, a alíquota congelada foi descongelada durante 7 segundos a 38 °C e submetida às mesmas análises citadas para a amostra de sêmen fresco com as sondas fluorescentes.

Nos ejaculados analisados foram consideradas quatro subpopulações, sendo estas:

II - Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal íntegra: Núcleo corado de azul pela sonda Hoechst 33342

IL - Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada: Núcleo azul e capuz acrossomal verde/amarelo, corado pela sonda FITC-PSA.

LI - Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal íntegra: Núcleo corado de vermelho pelo iodeto de propídio

LL - Membrana plasmática lesionada e membrana acrossomal lesionada: Núcleo em vermelho e acrossoma em verde/amarelo

Para a realização do ensaio de ligação, tanto o sêmen fresco como o descongelado tiveram a concentração padronizada para $0,5 \times 10^6$ spz/mL por diluição em meio TRIS-Citrato acrescido de gema de ovo, sem glicerol. Metade do volume obtido foi mantido em banho Maria a 38 °C e a outra, submetida a choque térmico, conforme descrito por Ström Holst (2000) modificado, no intuito de inviabilizar as células. Com estas duas partidas, foram realizados imediatamente o ensaio de ligação descrito a seguir. O sêmen a fresco foi incubado com a membrana perivitelina. Após 24 horas uma alíquota congelada da mesma partida foi descongelada e submetida às mesmas condições de incubação utilizados para o sêmen fresco. Após o descongelamento foram refeitos os testes TTR, HOST, e avaliados vigor e motilidade.

Para a correção das concentrações de 100×10^6 e 50×10^6 e $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL, para espermatozóides móveis/mL, multiplicou-se a concentração calculada em câmara de Neubauer pela motilidade.

3.2.3. Ensaio de ligação entre espermatozoide do cão doméstico e membrana perivitelina

Os ovos utilizados na experimentação foram obtidos de postura realizada no mesmo dia da experimentação, e não embrionados. A preparação da membrana perivitelina teve início na separação entre clara do ovo e gema. Após este procedimento, a gema intacta foi acondicionada em placa de petri contendo solução fisiológica estéril de NaCl a 0,9 %. A membrana perivitelina foi cortada com uso de material cirúrgico oftálmico e lavada cuidadosamente com uso de seringa e solução fisiológica estéril de NaCl a 0,9 %, até não haver mais resquícios visuais de gema ou clara. Em seguida a MPV foi transferida para outra placa de petri onde foi colocada contendo solução fisiológica estéril de NaCl a 0,9 %. Nesta última placa foram realizados os cortes dos fragmentos de membrana destinados ao ensaio de ligação. Estes procedimentos foram realizados com auxílio de um microscópio estereoscópico (Zeiss).

A técnica utilizada para obtenção e preparo da membrana, difere da descrita por Barbato et al., (1998). A membrana foi acondicionada sobre um halo de silicone

vazado de vão circular interno com diâmetro de 4 mm, e externo de 8mm, encaixado perfeitamente em um segundo halo de 8 mm de diâmetro, ficando a membrana fixada e com uma área exposta de 12,56 mm² (Fig. 1).

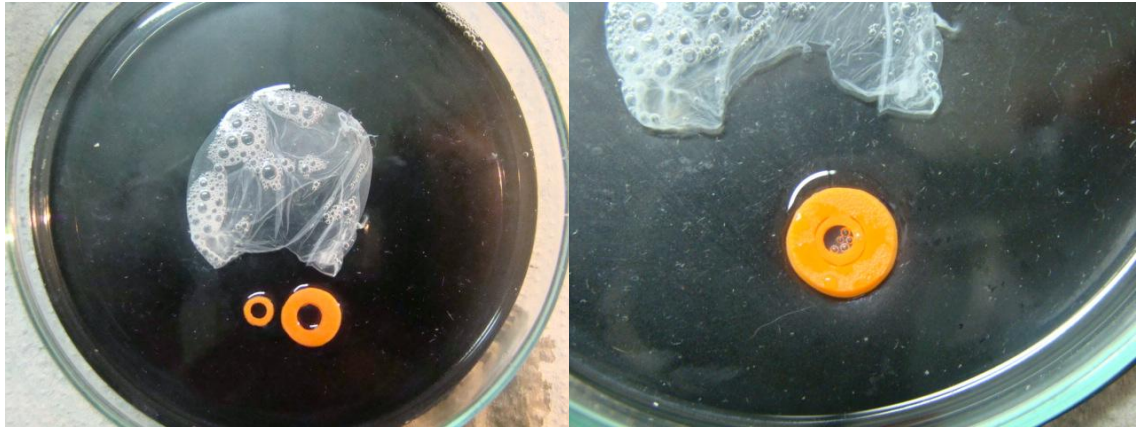


Figura 1 – Suporte de silicone para fixação da membraba perivitelina

Em um próximo passo, seis fragmentos de membrana foram transferidos para uma placa de cultivo. Cada fragmento foi acondicionado em uma escavação contendo 300 µL de meio TCM-199 modificado por Costa et al., (1987). A placa foi incubada em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, 95% de umidade relativa e 38 °C, onde permaneceu por 30 minutos para estabilização. Após este prazo, cada escavação recebeu 20 µL de sêmen com concentração de 0,5 x 10⁶ espermatozoides/mL, sendo três fragmentos incubados com os espermatozoides vivos e três com a partida de células mortas por choque térmico. Este procedimento foi adotado tanto para o sêmen a fresco como para o descongelado. Com 30 minutos de incubação dos fragmentos junto ao sêmen, foram adicionados 200 µL da sonda fluorescente Hoechst 33342, e o material foi homogeneizado por meio de movimentos circulares. Aos 50 minutos de incubação foram adicionados 20 µL de iodeto de propídio e novamente foi feita a homogeneização (CELEGHINI, 2005) modificado. Estes procedimentos foram realizados em ambiente escuro e sob placa aquecedora a 38 °C. Após 60 minutos de incubação, os fragmentos foram lavados quatro vezes em meio Talp-Hepes. Em seguida foi efetuada a montagem das lâminas, onde cada fragmento ainda no suporte, foi colocado entre lâmina e lamínula de vidro. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência

(Nikon) equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm), com um aumento de 400x. Todas as células espermáticas ligadas à membrana foram contadas.

3.2.4. Análises microscópicas

- Vigor e motilidade espermática: Os parâmetros foram avaliados a partir de uma gota de sêmen diluído entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C e observado em microscópio de luz (Olimpus). Os valores do vigor (intensidade de movimento) foram estabelecidos entre 0 e 5 e a motilidade espermática retilínea progressiva entre 0 e 100%, conforme as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Foi utilizado aumento de 400 vezes.

- Morfologia: Uma alíquota de sêmen foi adicionada em fixador Karnovsky até turvar a mistura. Posteriormente foram feitas lâminas pelo método de câmara úmida onde foram contabilizadas 200 células com o uso de microscópio de contraste de fase (Nikon). No caso da ocorrência de duas patologias em uma célula, foi considerada apenas a patologia mais grave. Os defeitos espermáticos foram subdivididos em maiores e menores conforme CBRA (1998).

- Teste hiposmótico (HOST): Uma alíquota de 20 µL de sêmen foi adicionada a 250 µL de solução hiposmótica de sacarose, a 150 mOsmol/Kg. Após 30 min de incubação a 37 °C foi adicionado 0,5 mL do fixador Karnovsky. Foram contadas 200 células no aumento de 1000 vezes, sendo o resultado expresso em porcentagem. A contagem foi realizada em microscópio de contraste (Nikon) de fase em preparação úmida. As células com cauda dobrada ou fortemente dobrada e cauda enrolada ou fortemente enrolada foram consideradas reativas ao teste hiposmótico. Para correção dos valores, a porcentagem destas patologias encontradas na análise morfológica foram subtraídas do resultado do respectivo hiposmótico.

- Teste de termorresistência (TTR): Uma alíquota de sêmen na concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL diluída em Tris-citrato com gema de ovo foi mantida em banho Maria a 38°C. A cada 20 minutos, a partir da coleta, uma amostra desta

alíquota foi avaliada para estabelecimento dos parâmetros vigor e motilidade, conforme descrito anteriormente. As observações foram feitas pelo período de duas horas, ou até que o vigor e a motilidade alcançassem valor nulo. Como resultado foi utilizado o tempo médio que os valores de vigor e motilidade levaram para atingir 3 e 30% respectivamente.

- Sondas fluorescentes: Após o protocolo de incubação descrito, uma gota do sêmen foi depositada entre lâmina e lamínula pré aquecida e avaliada em microscópio de epifluorescência (Nikon) equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm) nos aumentos de 400 e 1000 vezes. Foram contabilizadas 100 células por análise. Os resultados foram expressos em percentual de células coradas. Fez-se a leitura de duas amostras para o sêmen a fresco e duas para o descongelado, obtendo-se o resultado através da média entre as amostras.

- Controle positivo: uma alíquota de 40 µL de sêmen foi submersa três vezes em nitrogênio líquido seguidas de reaquecimento em banho Maria a 38 °C. Após este procedimento a amostra foi incubada com as sondas iodeto de propídio e Hoechst 33342 e analisada em microscópio de epifluorescência (Nikon) equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm) nos aumentos de 400 e 1000 vezes para avaliação do grau de lesão das membranas, conforme protocolo descrito.

- Ensaio de ligação: Os suportes de silicone contendo o fragmento de membrana foram colocados entre lâmina e lamínula. Os fragmentos de membrana foram visualizados em microscópio de epifluorescência (Nikon) equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm) nos aumentos de 400 e 1000 vezes. A leitura foi feita na área total exposta dos fragmentos de membrana.

3.2.5. Análise estatística

Foram realizadas três repetições, onde o sêmen coletado foi avaliado a fresco e após o descongelamento.

O comportamento das variáveis entre tratamentos foi submetido a análise pelo teste de Lillifors, para verificação de distribuição normal ou não das variáveis. Também foi analisado pelos testes de Cochran e Bartlett, para verificação da homogeneidade das variâncias. Para comparação das médias dos dados obtidos na análise de sêmen entre os tratamentos congelado e descongelado foi utilizado o teste F a 5% de significância.

As correlações entre e dentre as características avaliadas nos tratamentos sêmen fresco e descongelado foram obtidas por Correlação Simples de Pearson a 5% de significância.

Todas as análises foram realizadas com uso do software SAEG 9.1 (2007).

3.3. Resultados e Discussão

A opção de usar apenas um animal se deu pelo fato da grande variação individual dos cães na resposta do sêmen ao processo de congelamento/descongelamento (CHIRINÉA, 2008; MASCARENHAS, 2008). Assim, retirou-se o efeito macho.

Na Tabela 1 estão dispostas as médias, desvio padrões e coeficientes de variação dos resultados obtidos nos testes de rotina para avaliação do sêmen fresco e descongelado, bem como os resultados da coloração por sondas fluorescentes. Todos os testes de rotina aplicados apresentaram diferença entre os tratamentos de sêmen a fresco e descongelado ($p < 0,05$), ou seja, os testes de vigor e motilidade espermática, hiposmótico, termorresistência e morfologia espermática são eficientes na quantificação e qualificação de danos fisiológicos devido ao processo de congelamento. Os testes de rotina também mostraram-se sensíveis em outros estudos (MASCARENHAS, 2008; SILVA, 2005), bem como as sondas fluorescentes (CELEGHINI, 2005; SILVA, 2005; CHIRINÉA et al., 2006; NEVES, 2009).

Dentre as populações descritas a partir da coloração com sondas fluorescentes, Csermak Jr. (2011) descreve que aquelas de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada (IL) e membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (LI) são observadas em pequeno número não sendo importantes na qualificação de amostras avaliadas. No presente trabalho foi possível observar que as populações de espermatozoides com ambas membranas íntegras (II) e ambas membranas lesadas (LL) comportaram-se semelhante aos testes de rotina, sendo eficientes na predição de lesões durante o processo de congelamento do sêmen canino (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias seguidas de desvio padrão e coeficiente de variação (CV) dos testes de análise entre tratamentos

	A Fresco	Descongelado
Vigor	4,5 ± 0,00 ^a (-)	2,625 ± 0,48 ^b (18,28)
Motilidade %	95 ± 0,00 ^a (-)	30,25 ± 21,14 ^b (69,88)
Patologias %	21,87 ± 8,63 ^a (39,46)	43 ± 12,06 ^b (28,04)
HOST %	80,37 ± 9,45 ^a (11,75)	50,5 ± 16,42 ^b (32,51)
TTR	100,00 ± 34,64 ^a (34,64)	20,00 ± 20,00 ^b (100,00)
II %	68 ± 8,15 ^a (11,98)	10 ± 11,22 ^b (112,20)
LL %	8,5 ± 7,50 ^a (88,23)	55,12 ± 18,42 ^b (33,41)

Médias seguidas por letras diferentes entre colunas diferem a 5% de probabilidade pelo teste F

CV: Coeficiente de variação / II: ambas as membranas íntegras / LL: ambas as membranas lesionadas / HOST: teste hiposmótico / TTR: teste de termorresistência

Na tabela 2 estão descritos a média, desvios padrão e coeficiente de variação dos resultados observados nos testes de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha (MPV) nas amostras à fresco e descongelada do sêmen canino.

Nas amostras avaliadas após a morte celular por choque térmico, não foram observadas ligações significativas. Da mesma forma, Ström Holst et al. (2000), em testes de ligação de sêmen canino morto, à zona pelúcida homóloga concluíram que a ligação espermática é uma característica de células vivas.

Tabela 2 – Médias dos ensaios de ligação seguidas do desvio padrão e coeficiente de variação (CV)

	A Fresco	Descongelado
LigV IP	35,33 ± 17,47 ^a (49,45)	55,00 ± 25,00 ^a (45,45)
LigV H	130,66 ± 73,01 ^a (55,87)	3,50 ± 0,5 ^b (14,28)
LigV T	166,00 ± 79,54 ^a (47,91)	58,50 ± 24,5 ^a (41,88)

Médias seguidas por letras diferentes entre colunas diferem a 5% de probabilidade pelo teste F

CV: Coeficiente de variação / LigV IP: células ligadas à membrana coradas pelo iodeto de propídio incubadas com sêmen vivo / LigV H: células ligadas à membrana coradas pelo Hoechst 33342 incubadas com sêmen vivo / LigV T: total de células ligadas à membrana incubadas com sêmen vivo / LigM IP: células ligadas à membrana coradas pelo iodeto de propídio incubadas com sêmen morto / LigM H: células ligadas à membrana coradas pelo Hoechst 33342 incubadas com sêmen morto / LigM T: total de células ligadas à membrana incubadas com sêmen morto

A fertilização é um processo de fusão entre os gametas masculino e feminino que tem início no contato e reconhecimento entre estes gametas (HAFEZ & HAFEZ, 2004). A ligação espermatozoide – ovócito é um evento mediado por receptores da membrana plasmática do espermatozoide e uma ou mais glicoproteínas da zona pelúcida do ovócito (YANAGIMACHI, 1994). Desta forma, testes de ligação entre espermatozoides e a zona pelúcida do ovócito podem revelar danos que não poderiam ser avaliados em testes de microscopia de rotina (STRÖM HOLST et al., 2000). A ligação com a zona pelúcida permite ainda a avaliação do sêmen canino com espermatozoides lesados por métodos de criopreservação (HAY et al., 1997), assim como aqueles naturalmente inférteis (MAYENCO-AGUIRRE & PÉREZ CORTÉS, 1998).

A principal glicoproteína observada na superfície da zona pelúcida, implicada na ligação espermática, é a ZP3 (HAFEZ & HAFEZ, 2004), que mantém uma grande homologia entre espécies distintas e mesmo entre classes zoológicas. Ou seja, é possível uma grande homologia entre o sequenciamento de aminoácidos de animais tão distintos como aves e mamíferos. Este é o caso da ZP3 do ovócito canino em relação à ZP3 observada na membrana perivitelina da gema do ovo de galinha. Em bancos de dados de associações de pesquisa, como por exemplo o

GenBank é possível a obtenção, via *on line*, do perfil de aminoácidos de proteínas sequenciadas e também a sua comparação interespecífica. Desta forma foi possível a observação de que há uma homologia de aproximadamente 59% entre a ZP3 de cão e de galinha. Desta forma é possível a interação e consequente ligação de espermatozoides com a membrana perivitelina da gema do ovo de galinhas. Segundo Amorim (2008) e Santos (2009) o teste de ligação à membrana perivitelina pode assumir um importante papel na avaliação de sêmen de espécies domésticas.

No presente trabalho foi possível a observação de uma diferença ($p < 0,05$) na quantidade de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, corados pelo H \ddot{o} chst 33342, ligados a MPV no sêmen fresco em relação ao sêmen descongelado (Tabela 2). Neste sentido pode-se concluir que o processo de criopreservação gerou lesões incapacitantes na membrana plasmática do espermatozoide canino, assim como pode ser observado por Hay et al., (1997) em teste de ligação com ovócitos homólogos. Da mesma forma foi possível a observação de uma correlação positiva ($p < 0,05$) entre a população de espermatozoides com membranas íntegras (II) no sêmen a fresco, e o número de ligações de espermatozoides à MPV, também com o uso de sêmen a fresco (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores e significância de correlação por Correlação Simples de Pearson entre as variáveis no sêmen a fresco

	LIPF	LIPD	LHF	LHD	VTF	VTD
VF	-0,96					
VD			0,99		0,98	
MF						
MD						
PF	-0,97					
PD						
TTRF					-0,94	
TTRD			0,99		0,98	
HOSTF	0,99	0,94		-0,94		0,94
HOSTD			0,93		0,98	
IIF			0,99		0,94	
IID						
LLF						
LLD						

Os valores de correlação possuem significância a 5% de probabilidade

VF: Vigor do sêmen a fresco / **VD:** Vigor do sêmen descongelado / **MF:** Motilidade do sêmen a fresco / **MD:** Motilidade do sêmen descongelado / **PF:** Patologias totais no sêmen a fresco / **PD:** Patologias totais no sêmen descongelado / **TTRF:** teste de termorresistência do sêmen a fresco / **TTRD:** teste de termorresistência do sêmen descongelado / **HOSTF:** teste hiposmótico do sêmen a fresco / **HOSTD:** teste de termorresistência do sêmen descongelado / **IIF:** ambas as membranas íntegras no sêmen a fresco / **IID:** ambas as membranas íntegras no sêmen descongelado / **LLF:** ambas as membranas lesionadas no sêmen a fresco / **LLD:** ambas as membranas lesionadas no sêmen descongelado / **LIPF%:** células ligadas à membrana coradas pelo iodeto de propídio incubadas com sêmen vivo a fresco / **LIPD%:** células ligadas à membrana coradas pelo iodeto de propídio incubadas com sêmen vivo descongelado / **LHF%:** células ligadas à membrana coradas pelo Hoechst 33342 incubadas com sêmen vivo a fresco / **LHD%:** células ligadas à membrana coradas pelo Hoechst 33342 incubadas com sêmen vivo descongelado / **VTF%:** total de células ligadas à membrana incubadas com sêmen vivo a fresco / **VTD%:** total de células ligadas à membrana incubadas com sêmen vivo descongelado

Ainda em relação ao número de espermatozoides ligados à MPV, com sêmen fresco, correlações significativas e positivas foram observadas em relação ao vigor do sêmen descongelado, ao TTR do sêmen descongelado, ao HOST do sêmen descongelado (Tabela 3). Com estes resultados, é tentador correlacionar a qualidade do sêmen descongelado com os resultados obtidos com o sêmen a fresco, porém, somente o teste hiposmótico no sêmen a fresco apresentou correlação significativa positiva em relação ao número de células ligadas à MPV com

o uso do sêmen descongelado. Todavia, a existência de correlações entre o HOST e os testes de fertilidade in vivo ou in vitro na espécie canina ainda carece de maiores investigações (PEÑA-MARTINEZ, 2004). Assim, nas avaliações do sêmen a fresco, somente o HOST apresenta-se como um fator de previsibilidade da capacidade de ligação do sêmen canino após o descongelamento, nas condições testadas.

3.4. Conclusão

O teste de ligação de espermatozoides à membrana perivitelina da gema do ovo de galinha apresenta comportamento semelhante aos resultados dos testes de rotina da avaliação do sêmen, assim como os testes com o uso de sondas fluorescentes.

Neste estudo o teste hiposmótico no sêmen a fresco teve capacidade preditiva do números de espermatozoides ligados à MPV após o descongelamento do sêmen.

A membrana perivitelina associada à sonda Hoechst 33342 foi sensível aos efeitos deletérios do processo de congelamento/descongelamento no que tange à capacidade de ligação do espermatozoide. Sendo assim, nestas condições, pode ser útil como ferramenta para análise de diferentes protocolos de congelamento de sêmen canino.

3.5. Referências Bibliográficas

AMORIM, E.A.M. (2008). *Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e eqüinos na qualidade do sêmen*. Tese (Doutorado em Zootecnia), Viçosa – MG, 174p.

BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. (1998). A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. *Biology of Reproduction*, 58, 686-699.

CHIRINÉA, V. H. (2008). *Inseminação artificial com sêmen congelado em cães*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu-SP, 85 pp.

CORREA, J. R. & ZAVOS, P. M. (1994). The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42, p. 351-360.

CUNHA, I. C. N. da (2008). Exame andrológico do cão. *JBCA – Jornal Brasileiro de Ciência Animal*. 1(1), 40-65.

de los REYES, M.; PALOMINO, J.; LANGE, J. de; ANGUITA, C.; BARROS, C. (2009). *In vitro* sperm penetration through the zona pellucida of immature and *in vitro* matured oocytes using fresh, chilled and frozen canine semen. *Animal Reproduction Science*, 110, 37-45.

dos REIS, G. R.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P.; WEITZE, K. F.; AMANN, R.; KELLERS, C.; ZEMMRICH, J. (2003). Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozoides a um substrato sintético. *Pesq. agropec. bras.*, 38(11), 1343-1349.

EILTS, B. E. (2005). Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, 64, 685-691.

HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. (2004). *Reprodução Animal*. 7ª ed. Barueri, SP: Manole. 513 p.

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. (1997). Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 51(Suppl), 99–108.

HERRERA, C.; BROGLIATTI, G.; CAVIA, R., CONDE, P.; REVORA, M.; PASQUALINI, R.S. (2004). CASA sperm parameters and their relation with *in vitro* fertilization. In: *Proc. 15th Int. Cong. Anim. Reprod. Brazil*, p.411.

HOLT, W.V. (2000a). Basic aspects of frozen storage semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 3-22.

KUMI-DIAKA, J. (1993). Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 39, 1279-1289.

MASCARENHAS, R. M. (2008). *Avaliação individual e racial da qualidade do sêmen canino in natura e criopreservado em diferentes protocolos*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa-MG.

MAYENCO-AGUIRRE, A. M. & PÉREZ CORTÉS, A. B. (1998). Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa *Theriogenology* 50, 195–204.

PACE, M. M.; SULLIVAN, J. J. (1975). Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *Journal of Reproduction Fertility*, 23, 115-121.

PEÑA-MARTINEZ, A. I. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Repro. Scie.*, 82-83, 209-224.

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

ROTA, A; IGUER-OUADA, M; VERSTEGEN, J.P.; LINDE-FORSBERG, C. (1999). Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, 51, 1045-1058.

SANTOS, M. C. R. (2009). *Avaliação de métodos alternativos para análises da capacidade de ligação do espermatozoide caprino e estudo do polimorfismo no gene Izumo em caprino, devido à ação do congelamento do sêmen*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa-MG.

SILVA, A. R. (2005). *Criopreservação Do Sêmen Canino Diluído Em Tris: Avaliação Morfológica, Funcional E De Suas Interações Com Ovócitos Homólogos*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE.

STRÖM HOLST, B.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2000). Evaluation of chilled and frozen–thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility*, 119, 201–206.

TARDIF, S.; LAFOREST, J. P.; CORMIER, N.; BAILEY, J. L. (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology*, 52, 447-459.

THOMASSEN, R., SANSON, G., KROGENAES, A., FOUIGNER, J. A., ANDERSEN BERG, K., et al. (2006). Artificial Insemination with Frozen Semen in Dogs: a Retrospective Study of 10 Years Using a Non-Surgical Approach. *Theriogenology*, 66(6-7), 1645–1650.

YANAGIMACHI, R. (1994) Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction* pp 189–315 Eds E Knobil and J Neill. Raven Press, New York.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L. (1988). Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoa motility parameters. *Theriogenology*, 29, 1043-1055.

WATSON, P. F. (2000). The preservation of semen in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 1, 283-350.

4. Conclusão Geral

A combinação das sondas iodeto de propídio, Hoechst 33342 e FITC-PSA permitiu a individualização de quatro populações no ejaculado de cão doméstico.

O baixo número de correlações entre os testes de rotina e as populações distintas pelas sondas fluorescentes, permite incorporar estas em pesquisas de avaliação de sêmen, devido à alta especificidade das sondas.

A membrana perivitelina da gema do ovo de galinha associada à sonda Hoechst 33342 foi um substrato sensível à ligação de espermatozóides de partidas de sêmen de qualidades distintas, podendo nestas condições ser utilizada na avaliação de protocolos de congelamento/descongelamento.

ANEXOS

ANEXO I

Composição dos meios utilizados

TRIS-CITRATO

Componente	Quantidade
TRIS	24,0 g/L
Ácido cítrico	14,0 g/L
Glicose	8,0 g/L
Amicacina	2,0 g/L
Gema de ovo	200 g/L

Obs.: Não contém antibiótico e glicerol

TCM-199

Modificado por COSTA (1994)

Componente	Quantidade
TCM-HEPES	2,0 mL
NaHCO ₃	2,0 mL
BSA	800 µL
Lactato de Cálcio	500 µL
Piruvato	500 µL
PEN-Estrepto	200 µL
H ₂ O tridestilada (não qsp)	14 mL

Talp-Hepes

BAVISTER et al., (1983), modificado por COSTA, 1995

Componentes	mM	Quantidade
NaCl	114,0	1,6655 g
KCl	3,2	0,0596 g
NaHCO ₃	2,0	0,0420 g
NaH ₂ PO ₄	-	0,0120 g
Lactato de Sódio (60%)	10,0	0,219 mL
C ₆ H ₁₂ O ₆ (glicose)	5,0	0,2252 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,0	0,0735 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O a 50% (ESTÉRIL)	0,5	51 µL
HEPES	10,0	0,5957 g
Vermelho Fenol	-	0,0025 g
Pellicilina G sódica (1.659 UI/0,001g)	-	0,0150 g (25.000 UI)
H ₂ O tridestilada (qsp)	-	250 mL

ANEXO II

Diluições dos Fluoróforos para Preparo das Soluções Estoque e de Trabalho das Sondas Fluorescentes

Conforme CELEGHINI, 2005

Iodeto de Propídio

Solução estoque

25 mg de PI + 1 mL de DMSO (25 mg/mL)

Solução Trabalho (0,5 mg/mL)

20 µL da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 980 µL de DPBS

Solução trabalho (2 mg/mL)

80 µL da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 920 µL de DPBS

Armazenar em freezer, no escuro.

Hoescht 33342

Solução estoque

100 mg H342 + 4 mL de DMSO (25 mg/mL)

Solução trabalho

1,6 µL da solução estoque (25 mg/mL) + 998,4 µL de DPBS (40 µg/mL)

Armazenar a – 20°C no escuro

FITC-PSA

Solução trabalho (100 µg/mL)

2 mg de FIT-PSA + 20 mL de DPBS +10% de solução de azida de sódio 10%

Aliquotar e armazenar a 4 °C, no escuro.