

LINA ROSA CARAZO BUSTAMANTE

**SELEÇÃO ESPERMÁTICA EM AMOSTRAS EJACULADAS E
EPIDIDIMÁRIAS DE CÃES DOMÉSTICOS E EFEITO DA ADIÇÃO DE
FLUIDO PROSTÁTICO**

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
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C262s
2019 Carazo Bustamante, Lina Rosa, 1984-
Seleção espermática em amostras ejaculadas e epididimárias de
cães domésticos e efeito da adição de fluido prostático / Lina Rosa
Carazo Bustamante. - Viçosa, MG, 2019.
xv, 73 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Caães - Reprodução. 2. Epidídimo. 3. Sêmen. 4. Colóides. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.


CDD 22. ed. 636.7082

LINA ROSA CARAZO BUSTAMANTE

**SELEÇÃO ESPERMÁTICA EM AMOSTRAS EJACULADAS E
EPIDIDIMÁRIAS DE CÃES DOMÉSTICOS E EFEITO DA ADIÇÃO
DE FLUIDO PROSTÁTICO**

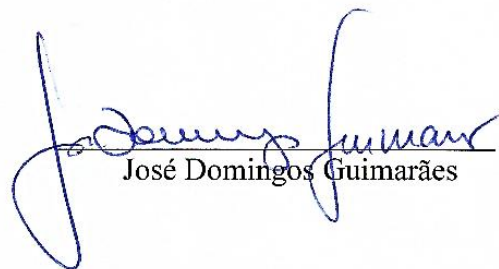
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 28 de fevereiro de 2019.


Yamê Fabres R. Sancler da Silva


Rebeca Marques Mascarenhas


Jurandy Mauro Penitente Filho


José Domingos Guimarães


Tarcízio Antônio Rego de Paula
(Orientador)

*“Felicidad no es hacer lo que uno quiere
sino querer lo que uno hace”*

Jean Paul Sartre

*Esta tese é fruto do trabalho em equipe, a melhor que
alguém possa ter...
A Luna, Lorena e Danilo.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e da maneira mais especial, agradeço às minhas filhas Luna e Lorena, por me ensinar que o verdadeiro sentido da vida está em ser feliz! Ao meu esposo e melhor amigo Danilo, pelo amor e apoio incondicional durante esta jornada, esta conquista é nossa!

Aos meus pais Maria Victoria e Nicanor, meus irmãos Nicanor e Bianca, aos meus avós Carlos (*in memorian*), Elibeth, Ety e Nicanor (*in memorian*), obrigada pelo amor e ensinamentos. Aos meus sogros Izabel e Norton, obrigada pela ajuda e apoio.

Ao meu orientador Tarcízio, sou muito grata por me ensinar outros cenários da nossa profissão, por me permitir entrar na sua equipe de trabalho e na sua família, e pela tolerância em minha condição de mãe.

Ao pessoal do REPAAS Leticia, Moema, Mayra, Milene, Marcelo, Fernanda, Leanes, Vinicius, Gê, Thyara, Carlão e aos colegas e amigos de profissão, sempre dispostos em esclarecer minhas dúvidas e ajudar no projeto Bruna, Sanely, Paula, Denise, Jurandy, Yamê, JD, Faider, Adriana, Erly, Javier “Tatinha” e prof. Leandro Licursi.

Aos estagiários que participaram das atividades: Rebecca, Jorge, Larissa, Aline, Amanda, Ana Carolina, Anna Flávia, Chris, Julia, Marcela, Natalie... muito obrigada pela disposição, pelas risadas e pelo café!

Agradeço à fidelidade de minhas “peludinhas” Bolinha e Cristal e aos proprietários de animais que disponibilizaram material para nossos estudos.

Aos amigos de coração: Luz Stella, Martica, família Chica, Andrez, Jhennifer, Giselle, Maycon, Andrés, Marcio, Lecir, Guilherme, Damares, Tatiana, obrigada pelos momentos de descontração!

Aos funcionários do CEPAS: Sônia (*in memorian*) e seu Romão, aos funcionários do DVT-UFV: Luciano, “Camilin”, seu “Didi”, Aloízio, Zé de Oliveira, obrigada pelas horas de papos e cafezinhos, e de forma muito especial à “mamãe” dos discentes da Pós DVT-UFV: “Rosi”, obrigada pela parceria e apoio incondicional!

À profa. Jane Morrell (Swedish University of Agricultural Sciences) pelas orientações durante sua visita e por ceder material para o experimento. Ao programa

Erasmus, pela concessão da bolsa de estudos para aperfeiçoamento no exterior, assim como à equipe do Laboratório de Reprodução da Universidad de Córdoba – Espanha: Prof. Jesus Dorado, Prof. Manuel Hidalgo, Isa Ortiz, Blasi Pereira, Maria Diaz, Azahara Camacho, Cesar Consuegra, e a todos os envolvidos, obrigada pelo acolhimento e apoio durante experimento.

À Sociedade Viçosense de Proteção aos Animais (SOVIPA), por ter cedido material para o experimento, assim como à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

¡GRACIAS!

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

Lina Rosa Carazo Bustamante, filha de Nicanor Carazo Lambis e Maria Victoria Bustamante Cano, esposa de Danilo Fernandes de Oliveira, nasceu em Cartagena de Indias - Bolivar (Colômbia) em 02 de março de 1984.

Em 2002 ingressou no curso de Medicina Veterinária e Zootecnia na Fundação Universitaria San Martín (Barranquilla – Atlântico, Colômbia), realizando em 2004, transferência para a Universidad de Córdoba (Montería – Córdoba, Colômbia), formando-se em junho de 2010.

Em 2009 executou atividades de Pós-Graduação como aluna não-vinculada na Universidade Federal de Viçosa, MG – Brasil, e em agosto de 2010 ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na mesma universidade na área de Reprodução e Produção Animal, tendo apresentado sua dissertação de mestrado em julho de 2012.

Em fevereiro de 2014 iniciou doutorado no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, MG – Brasil, na área de Morfofisiologia de Animais Domésticos e Selvagens, tendo apresentado sua tese em fevereiro de 2019.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	3
CAPÍTULO 1: EFEITO DO FORMATO E GRAU DE INCLINAÇÃO DO TUBO DE MIGRAÇÃO, EM PROCEDIMENTO DE <i>SWIM-UP</i> MODIFICADO COM ADIÇÃO DE UM COLOIDE COMERCIAL, NO SÊMEN CANINO	8
RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 Local e comissão de ética	11
2.2 Animais e coleta seminal	11
2.3 Avaliação seminal	11
2.4 Delineamento experimental	11
2.5 Análises estatísticas	13
3. RESULTADOS	14
4. DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÃO	19
6. REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2: EFEITO DO FLUÍDO PROSTÁTICO NA VIABILIDADE DE AMOSTRAS ESPERMÁTICAS EPIDIDIMÁRIAS DE CÃES DOMÉSTICOS REFRIGERADAS, UTILIZANDO DIFERENTES DILUIDORES	25
RESUMO	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Local e comissão de ética	28
2.2 Animais	28
2.3 Obtenção das amostras espermáticas epididimárias	28
2.4 Avaliação das amostras espermáticas epididimárias	29

2.5 Delineamento experimental.....	30
2.6 Obtenção do fluido prostático	30
2.7 Resfriamento	30
2.8 Análises estatísticas	31
3. RESULTADOS.....	31
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	38
6. REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 3: USO DA CENTRIFUGAÇÃO EM CAMADA ÚNICA ATRAVÉS DE COLOIDE NA SELEÇÃO DE AMOSTRAS ESPERMÁTICAS EPIDIDIMÁRIAS DE CÃO DOMÉSTICO COM E SEM A ADIÇÃO DE FLUÍDO PROSTÁTICO. USO POTENCIAL EM ANIMAIS SELVAGENS	
RESUMO	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 Local e Comissão de Ética	49
2.2 Animais	49
2.3 Obtenção das amostras espermáticas epididimárias.....	50
2.4 Avaliação das amostras espermáticas epididimárias.....	50
2.5 Delineamento experimental.....	51
2.6 Obtenção do fluido prostático	51
2.7. Centrifugação em camada única em coloide	52
2.8 Resfriamento	53
2.9 Análises estatísticas	53
3. RESULTADOS.....	53
4. DISCUSSÃO	59
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS.....	65
CONCLUSÕES GERAIS	73

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC: Androcoll-C™
- AEEs: amostras espermáticas epididimárias
- ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça
- AO: laranja de acridina
- BCF: frequência de batimento flagelar cruzado
- DT: defeitos espermáticos totais
- FITC-PNA: isotiocianato de fluoresceína conjugada com a aglutinina do amendoim (*Arachis hypogaea*)
- FP: fluido prostático
- FR: fluxo retrógrado
- IMA: integridade de membrana acrossomal
- IMP: integridade de membrana plasmática
- IP: iodeto de propídio
- LIN: linearidade
- MM: meio de manutenção comercial
- MOT: motilidade espermática
- PMOT: motilidade progressiva
- SF: soro fisiológico
- SLC centrifugação coloidal em camada única
- STR: retilinearidade
- SU: *swim-up*
- SU-AC: *swim-up* modificado com adição do coloide comercial Androcoll-C™
- TTR: teste de termorresistência
- VAP: velocidade média da trajetória
- VCL: velocidade curvilínea
- VIG: vigor espermático
- VSL: velocidade linear progressiva
- WOB: índice de oscilação ou *wobble*

RESUMO

CARAZO, Lina Rosa Bustamante, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Seleção espermática em amostras ejaculadas e epididimárias de cães domésticos e efeito da adição de fluido prostático.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência da seleção espermática em amostras de ejaculados e epididimárias de cães domésticos, assim como verificar o efeito da adição de fluido prostático em amostras epididimárias, previamente ao resfriamento. Para tal, foram realizados três experimentos. No experimento 1, objetivou-se testar a eficiência da técnica de seleção espermática *swim-up* modificado com adição de um coloide comercial (Androcoll-C™) (SU-AC), quando realizada em diferentes formatos e grau de inclinação do tubo de migração, na tentativa de aumentar as taxas de recuperação e a qualidade espermática em sêmen canino fresco. Quinze amostras seminais obtidas de três cães foram submetidas aos tratamentos a seguir: T0-Control: sêmen diluído em diluente comercial; T1: SU-AC em tubo Falcon, em posição vertical; T2: SU-AC em tubo de base arredondada, em posição vertical e T3: SU-AC em tubo de base arredondada, posicionado a 45°; após 3 minutos o T2 e T3 foram avaliados e outra alíquota de meio diluente foi repostada e avaliada 30 minutos depois, constituindo os tratamentos T2a e T3a, respectivamente. Não houve diferenças nas taxas de recuperação espermática, defeitos espermáticos totais, integridade de membrana plasmática e integridade de membrana acrossomal entre os tratamentos ($P>0,05$); houve uma diminuição dos parâmetros cinéticos, independente do formato do tubo de migração e sua inclinação em relação ao T0 ($P<0,05$); em posição vertical o formato do tubo não mostrou diferenças nas avaliações seminais ($P>0,05$); houve diminuição das patologias espermáticas quando usado o tubo de base arredondada inclinado, verificado na avaliação de 30 min após a renovação do meio. Conclui-se que não há melhora dos parâmetros cinéticos avaliados após a técnica de SU-AC; as taxas de recuperação espermática e a integridade celular, não são influenciadas pelo uso de tubos de migração de diferentes formatos e inclinação durante a realização da técnica de SU-AC; o SU-AC permite a obtenção de um número menor de patologias espermáticas, quando realizado em tubo de migração de base arredondada e inclinado com renovação do meio no tubo de migração, com

recuperação e avaliação aos 30'. No experimento 2, objetivou-se verificar o efeito da adição de 10 % de fluido prostático (FP) canino, em amostras espermáticas epididimárias (AEEs) prévio ao resfriamento por 24 horas entre 4 - 6 °C, obtidas por meio da técnica de fluxo retrógrado (FR) com uso de meio de manutenção comercial (MM) e soro fisiológico (SF). Foram obtidas AEEs a partir de oito pares de conjuntos testículo-epidídimo, pela técnica de FR com perfusão de MM ou SF com adição de ar. As AEEs foram padronizadas para 50×10^6 de espermatozoides / mL em MM (T1); as amostras coletadas com SF, foram subdivididas em três alíquotas, sendo uma ajustada para 50×10^6 de espermatozoides / mL em SF (T2); outra alíquota foi ajustada para 50×10^6 de espermatozoides / mL com MM acrescido de 10 % de SF (T3); a terceira alíquota foi ajustada para 50×10^6 de espermatozoides / mL com MM acrescido de 10 % de FP (T4). Durante 24 horas os tratamentos foram resfriados entre 4 – 6 °C e posteriormente avaliados quanto a motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), morfologia espermática, integridade funcional da membrana plasmática e teste de termorresistência (TTR). Não houve efeito ($P>0,05$) do MM ou do SF, na quantidade e qualidade dos espermatozoides recém coletados, porém, a preservação das amostras em presença de MM durante o resfriamento, influenciou favoravelmente na MOT, VIG e longevidade das amostras ($P<0,05$). A integridade funcional da membrana plasmática e as patologias espermáticas não mostraram diferenças ($P>0,05$) após resfriamento. Ao avaliar isoladamente a influência da adição 10 % de FP ao MM, não foram observadas diferenças nos parâmetros avaliados ($P>0,05$). Conclui-se que a técnica de fluxo retrógrado para recuperação de espermatozoides caninos pode ser realizada mediante perfusão de SF ou MM com adição de ar, sem alterar a qualidade imediata da amostra; para obtenção de características espermáticas desejáveis e duradouras, as amostras armazenadas em MM oferecem melhores resultados após 24 horas de resfriamento; o MM com acréscimo de 10 % de fluido prostático adicionado em AEEs submetidas à refrigeração por 24 horas entre 4 - 6 °C não melhora significativamente os parâmetros qualitativos cinéticos, de integridade de membrana plasmática e do percentual de células normais. Já no experimento 3, objetivou-se avaliar a qualidade de AEEs coletadas por FR, submetidas ao processo de seleção em camada única de coloide (SLC) e à adição de 10 % de FP canino, prévio ao resfriamento por até 72 horas entre 4 – 6 °C. Oito pares de conjuntos testículo-epidídimo foram refrigerados durante 24 horas entre 4 – 6 °C (resfriamento *in situ*).

As AEEs de ambos os epidídimos foram obtidas por FR usando para a perfusão MM e ar, sendo as AEEs associadas posteriormente em uma única amostra. Após avaliações espermáticas, as AEEs de cada animal foram subdivididas e submetidas a dois grupos de centrifugação: G1 – AEEs submetidas à SLC, com o coloide Androcoll-C™ (AC), e G2 – AEEs centrifugada com SF; as amostras obtidas em cada grupo foram ressuspendidas com ou sem FP, para preparação dos tratamentos: T1, AEE centrifugada com AC ressuspendida em MM acrescido de 10 % de FP; T2, AEE centrifugada com AC ressuspendida em MM acrescido de 10 % de SF; T3, AEE centrifugada com SF ressuspendida em MM acrescido de 10 % de FP e T4, AEE centrifugada com SF ressuspendida em MM acrescido de 10 % de SF. Após novas avaliações espermáticas os tratamentos foram refrigerados por até 72 horas entre 4 - 6 °C (resfriamento *ex situ*). Após 24 horas de resfriamento *ex situ* e após 48 horas adicionais (ou seja, 72 horas desde a coleta das AEEs), foram realizadas avaliações espermáticas nos diferentes tratamentos. As taxas de recuperação espermática foram de 18 e 38 % (para SLC e centrifugação convencional, respectivamente). Não houve diferenças ($P>0,05$) entre os parâmetros espermáticos antes e após centrifugações. Após 24 horas de resfriamento *ex situ* foi observada maior MOT no T4 em relação T2, e maior VIG no T3 em relação ao T2 ($P<0,05$). Após o TTR o T3 e T4 apresentaram performance superior daqueles submetidos à SLC. Após 72 horas de resfriamento *ex situ* o VIG no T3 foi superior comparado ao T1 e T2 ($P<0,05$). Os defeitos maiores, menores e totais foram menores em ao menos um dos tratamentos submetidos a SLC ($P<0,05$). Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a perfusão por FR com adição de ar permite a obtenção de AEEs com características espermáticas aceitáveis; a taxa de recuperação é maior nas AEEs centrifugadas com SF do que a obtida após SLC, porém, a SLC previne o aumento de patologias espermáticas após 72 horas de resfriamento; já o acréscimo de 10 % de FP no MM não tem efeito sobre as AEEs nas condições amostradas; as AEEs resfriadas por 24 horas *in situ* e por até 72 horas *ex situ* entre 4 - 6 ° C apresentam parâmetros espermáticos compatíveis para utilização em programas de reprodução, com uso potencial em carnívoros silvestres.

ABSTRACT

CARAZO, Lina Rosa Bustamante, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Sperm selection in ejaculated and epididymary samples of domestic dogs and the effect of prostatic fluid addition.** Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

This work was carried out to evaluate the efficiency of sperm selection in ejaculated and epididymal samples of domestic dogs and to verify the effect of the addition of prostatic fluid in epididymal samples, prior to cooling. Three experiments were carried out. In experiment 1, the objective was to test the efficiency of the modified swim-up sperm selection technique adding a commercial colloid (Androcoll-C™) (SU-AC), performed in different formats and degree of slant of the migration tube, in an attempt to increase recovery rates and sperm quality in fresh canine semen. Fifteen seminal samples obtained from three different dogs were submitted to the following treatments: T0-Control: semen diluted in commercial diluent; T1: SU-AC in Falcon tube, vertically positioned; T2: SU-AC in round base tube, vertically positioned and T3: SU-AC in round base tube, positioned at 45°; after 3' T2 and T3 were evaluated and another medium aliquot was replaced and evaluated 30 minutes later, constituting the treatments T2a and T3a, respectively. There were no differences in sperm recovery rates, total sperm defects, plasma membrane integrity and acrosomal membrane integrity between treatments ($P>0.05$); there was a decrease in kinetic parameters, regardless of the shape of the migration tube and its slope in relation to T0 ($P<0.05$); in a vertical position, the tube shape did not show differences in seminal evaluations ($P>0.05$); there was a decrease in the spermatic pathologies when the slant rounded base tube was used, verified in the 30 min evaluation after the renewal of the medium. It is concluded that there is no improvement of the kinetic parameters evaluated after the SU-AC technique; sperm recovery rates and cell integrity are not influenced by the use of migration tubes of different shapes and slope during the SU-AC technique; the SU-AC allows to obtain a smaller number of spermatic pathologies, when performed in a rounded and inclined base migration tube, with renewal of the medium in the migration tube with recovery and evaluation at 30 min. In the experiment 2, the objective was to verify the effect of the addition of prostatic fluid (PF) on epididymal sperm samples (ESS), cooled for 24 hours, at 4 - 6 ° C, obtained through a retrograde

flow (RF) using a commercial maintenance's medium (MM) and saline solution (SS). ESS were obtained from eight pairs of testis-epididymis sets by the RF technique with infusion of MM or SS with addition of air. The ESS were standardized to 50×10^6 spermatozoa / mL in MM (T1); the samples collected with SS were subdivided into three aliquots, with one of them adjusted to 50×10^6 spermatozoa / mL in SS (T2); another aliquot was adjusted to 50×10^6 spermatozoa / mL with MM plus 10 % SS (T3); and the third aliquot was adjusted to 50×10^6 spermatozoa / mL with MM plus 10 % PF (T4). During 24 hours the treatments were cooled at 4 - 6 ° C and later evaluated for sperm motility (MOT), sperm vigor (VIG), sperm morphology, functional integrity of the plasma membrane and thermoresistance test (TRT). There was no effect ($P>0.05$) of MM or SS, on the quantity and quality of newly collected spermatozooids; however, the preservation of the samples in the presence of MM during the cooling, favorably influenced ($P<0.05$) in the MOT, VIG and longevity of the samples. Functional integrity of the plasma membrane and spermatid pathologies did not show differences ($P>0.05$) after cooling. When evaluating the influence of the 10 % PF addition to the MM, no significant differences ($P>0.05$) were observed in the evaluated parameters. It is concluded that the RF technique for canine sperm retrieval can be performed by infusion of SS or MM with addition of air, without altering the immediate quality of the sample; to obtain desirable and long lasting sperm characteristics, samples stored in MM give better results after 24 hours of cooling; the MM with a PF 10% added in ESS subjected to refrigeration for 24 hours between 4 - 6 ° C does not significantly improve the kinetic parameters, plasma membrane integrity and the percentage of normal cells. In the experiment 3, the objective was to evaluate the quality of ESS collected by RF, submitted to the single-layer centrifugation process through colloid (SLC) and sensitization with PF prior to cooling for up to 72 hours at 4 - 6 ° C. Eight pairs of testis-epididymis were refrigerated for 24 hours at 4 - 6 ° C (*in situ*). The ESS of both epididymis were obtained by RF using MM and air for perfusion and were later associated in a single sample. After sperm evaluation, the ESS of each animal were subdivided and submitted to two groups of centrifugation: G1 - ESS submitted to SLC with Androcoll-C™ (AC), and G2 - ESS centrifuged with SS; the samples obtained in each group were resuspended with or without PF to prepare the treatments: T1, ESS centrifuged with AC resuspended in MM plus 10 % PF; T2, ESS centrifuged with AC resuspended in MM plus 10 % SS;

T3, ESS centrifuged with SS resuspended in MM plus 10 % PF and T4, ESS centrifuged with SS resuspended in MM plus 10 % SS. After further sperm evaluations, the treatments were refrigerated for up to 72 hours at 4 - 6 ° C (*ex situ*). After 24 hours of cooling and after an additional 48 hours (resulting in 72 hours from the collection of ESS), sperm evaluation of each treatment was performed. Sperm recovery rates were 18 and 38% (for SLC and conventional centrifugation, respectively). There were no differences ($P>0.05$) between the sperm parameters before and after centrifugations. After 24 hours of cooling, it was observed higher MOT in T4 in relation to T2, and higher VIG in T3 with respect to T2 ($P <0.05$). After TRT, T3 and T4 presented higher performance than those submitted to SLC. After 72 hours of cooling VIG at T3 was higher compared to T1 and T2 ($P<0.05$). The major, minor and total defects were lower in at least one of the treatments submitted to SLC ($P<0.05$). Thus, perfusion by RF with addition of air allow to obtain ESS with acceptable sperm characteristics; the recovery rate is higher in ESS centrifuged with SS than that obtained after SLC; however, SLC prevent the increase of sperm pathologies after 72 hours of cooling; yet, the increase of 10 % of PF in the MM has no effect on the ESS in this experimental conditions; the ESS cooled for 24 hours *in situ* and up to 72 hours *ex situ* between a 4 - 6 ° C have compatible sperm parameters for use in reproduction programs, with potential use in wild carnivores.

INTRODUÇÃO GERAL

Aliado às tecnologias de reprodução assistida, a criopreservação de sêmen ou de amostras obtidas do epidídimo, tem sido fundamental para o avanço da ciência reprodutiva e de conservação das espécies (Varesi et al., 2014; Jewgenow et al., 2017). De acordo com a lista vermelha da International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2018), mais de 26.000 espécies encontram-se ameaçadas de extinção; nesse sentido, a formação de germoplasmas tem se tornado uma alternativa para o uso posterior de material genético, em programas de conservação ou em animais domésticos de alto valor comercial (Assumpção et al., 2016; Jewgenow et al., 2017).

O desenvolvimento de biotecnologias utilizando animais domésticos filogeneticamente próximos, como modelo experimental, tem ganhado grande destaque. Neste cenário, o cão doméstico vem desempenhando importante papel, permitindo a pesquisa, o aprimoramento e a aplicabilidade dessas tecnologias às espécies silvestres ameaçadas (Luvoni et al., 2003; Buranaamnuay, 2018).

Dentre as técnicas que visam melhorar a qualidade das amostras espermáticas têm-se aquelas que separam os espermatozoides do plasma seminal e as que visam selecionar uma subpopulação espermática de melhor qualidade (como o *swim-up*: SU e a centrifugação coloidal em camada única: SLC) (Berger et al., 1985; Bukowska et al., 2011; Morrell et al., 2016). No presente trabalho, o primeiro experimento foi baseado na metodologia de SU modificado, usado por Dorado et al. (2015) também em cães, que inclui a adição de Androcoll-C™ à amostra seminal, agindo como filtro de seleção espermática. Este SU modificado (SU-AC) se apresenta como uma metodologia que oferece maior simplicidade de execução, em comparação com a SLC.

Por outro lado, em animais domésticos e silvestres, as coletas epididimárias efetuadas com maior frequência após castração ou óbito, podem ser realizadas utilizando várias metodologias que têm sido aplicadas previamente em distintas espécies, podendo citar: a fragmentação e flutuação da cauda do epidídimo (felino: Chatdarong et al., 2010; canino: Bergo, 2018); compressão da cauda do epidídimo com pinça hemostática ou lâmina de vidro (canino: Pennacchisavi *et al.*, 2015); fístula cirúrgica (rato: Gilmore et al., 1971) e a perfusão por fluxo retrógrado (FR) do ducto deferente e cauda do epidídimo (veado: Martinez-Pastor et al., 2006; canino: Batista

et al., 2016; bovino: Benítez et al., 2018; equinos: Ellerbrock et al., 2017); sendo que algumas dessas técnicas resultam em elevada quantidade de contaminantes, os quais representam fontes de espécies reativas de oxigênio, prejudiciais aos espermatozoides (Valeanu & Drugociu, 2014; Hori et al., 2015). Nesse sentido, a técnica de perfusão por FR, a mesma usada nos experimentos 2 e 3 do presente trabalho, tem resultado na recuperação de amostras espermáticas epididimárias (AEEs) mais límpidas e com melhor rendimento quantitativo (Muñoz-Fuentes et al., 2014; Bergo, 2018).

Adicionalmente, estudos anteriores demonstraram que o acréscimo de fluido prostático (FP) em amostras espermáticas caninas melhora a cinemática espermática (Korochkina et al., 2014), diminui o percentual de patologias espermáticas (Nöthling et al., 2007) e aumenta as taxas de concepção após inseminação artificial (Nöthling et al., 2005; Hori et al., 2015) de sêmen criopreservado.

No presente trabalho, também foram avaliados os efeitos da centrifugação em camada única para a seleção de AEEs caninas. A SLC é uma técnica que através do coloide espécie-específico (Androcoll-C™) seleciona espermatozoides de melhor qualidade (Morrell et al., 2019), o que a torna interessante para uso em tecnologias de reprodução assistida. A SLC tem sido amplamente estudada em amostras seminais de animais domésticos (Morrell et al., 2016) e AEEs de animais selvagens (Muñoz-Fuentes et al., 2014; Anel-López et al., 2015), mas pouco estudada na seleção de AEEs caninas, como no presente estudo.

Finalmente, visto que o intuito da recuperação espermática epididimária é a preservação do material genético para uso posterior em tecnologias de reprodução assistida, no presente trabalho foi considerado verificar a viabilidade das AEEs após armazenamento sob resfriamento *in situ* (resfriamento dos conjuntos testículo-epidídimo) e/ou *ex situ* (resfriamento das amostras espermáticas) por até 72 horas entre 4 – 6 °C. Diante disso, objetivou-se com o presente trabalho, verificar a seleção de espermatozoides de melhor qualidade em sêmen e em amostras espermáticas epididimárias de cães domésticos e avaliar a influência da adição de fluido prostático prévio ao resfriamento de amostras espermáticas epididimárias.

REFERÊNCIAS

ANEL-LÓPEZ, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; SOLER, A. J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; GARDE, J. J.; MORRELL, J. M. Use of Androcoll-S after thawing improves the quality of electroejaculated and epididymal sperm samples from red deer. **Animal Reproduction Science**, v. 158, p. 68–74. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.04.009>

ASSUMPÇÃO, T. I.; SANTOS, A. L. Q.; MACEDO, G. G.; PEIXOTO, L. R.; ZAMPINI, A. C. A. Coleta e avaliação morfológica dos espermatozoides epididimários de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer. Anais do VIII Encontro sobre Animais Selvagens. III Simpósio sobre Medicina e Conservação da Fauna do Cerrado – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG, p.49-54, 2016.

BATISTA, M.; VILAR, J.; ROSARIO, I.; TERRADAS, E. Influence of different anaesthetic protocols over the sperm quality on the fresh, chilled (4°C) and frozen-thawed epididymal sperm samples in domestic dogs. **Reprod Dom Anim**, p.1–8, 2016.

BENÍTEZ-GONZÁLEZ E.; CHAMBA-OCHOA H.; LUZÓN-CEVALLOS F.; SÁNCHEZ-CARRILLO J. Comparative evaluation of two methods of spermatoc recovery of post-mortem bovine epididymis. **Abanico veterinario**. v.8, n.1, p.59-74. 2018.

BERGER, T.; MARRS, R. P.; MOYER, D. L. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. **Fertility and Sterility**. v. 43, n.2. 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)48384-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)48384-6)

BERGO, L. C. F. **Comparação de técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários em cães.** 2018. p. 36. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Área Morfofisiologia dos animais domésticos e selvagens - Universidade Federal de Viçosa, 2018.

BUKOWSKA, D.; KEMPISTY, B.; SIKORA, J.; JACKOWSKA, M.; WOZNA, M.; ANTOSIK, P.; PIOTROWSKA, H.; BUDNA, J.; JASKOWSKI, J. M. The effect of swim-up purification and incubation of cells on sperm viability in dogs of different ages. **Veterinarni Medicina.** v. 56, n. 5, p.248–254. 2011. DOI: 10.17221/1560-VETMED

BURANAAMNUAY, K. Cryopreservation and storage of cat epididymal sperm using –75 °C freezer vs liquid nitrogen. **Animal Reproduction Science,** v. 191, p. 56–63. 2018.

CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; MORRELL, J. M. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. **Theriogenology.** v. 73, p. 1284–1292. 2010.

DORADO, J.; GÁLVEZ, M. J.; DEMYDA-PEYRÁS, S.; ORTIZ, I.; MORRELL, J. M.; CRESPO, F.; GÓSSALVEZ, J.; HIDALGO, M. Differences in preservation of canine chilled semen using simple sperm washing, single-layer centrifugation and modified swim-up preparation techniques. *Reproduction Fertility and Development.* v. 28, n.10. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD15071>

ELLERBROCK, R. E.; PRELL, M.; STEWART, J. L.; BOJKO, M. S.; LIMA, F. S.; CANISSO, I. F. Comparison of centrifugation and non-centrifugation methods to cryopreserve stallion epididymal semen. **Journal of Equine Veterinary Science,** v. 50, p. 27-32. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.11.005>

GILMORE, D. P.; HOOKER, R. H.; CHANG, M. C. A technique for the collection by fistula of epididymal spermatozoa from the rat. **J Reprod Fertil**. v. 25, n.1, p: 137-40. 1971.

HORI, T.; ATAGO, T.; KOBAYASHI, M.; KAWAKAMI, E. Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality, **J. Vet. Med Sci**, v. 77, n. 5, p. 625–630. 2015. DOI: 10.1292/jvms.14-0421.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-2. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10/10/2018.

JEWGENOW, K.; BRAUN, B.C.; DEHNHARD, M.; ZAHMEL, J.; GOERITZ, F.; Research on reproduction is essential for captive breeding of endangered carnivore species. **Reprod Dom Anim**, v. 52 (Suppl. 2), p. 18–23. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12836>

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

KOROCHKINA, E.; JOHANNISSON, A.; LAVANYA GOODLA; MORRELL, J. M.; AXNER, E. Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozen-thawed canine epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 82, p. 1206–1211. 2014. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.06.024

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL. L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v.65, p.471–485, 2006.

MORRELL, J. M.; ALSINA, M. S.; ABRAHAM, M. C.; SJUNNESSON, Y. Practical applications of sperm selection techniques for improving reproductive efficiency. **Anim. Reprod.** v.13, n.3, p.340-345. 2016. DOI: 10.21451/1984-3143-AR876.

MORRELL, J. M.; NÚÑEZ-GONZÁLEZ, A.; CRESPO-FÉLEZ, I.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, S.; MARTÍNEZ ALBORCIA, M. J.; FERNÁNDEZ-ALEGRE, E.; DOMINGUEZ, J.C.; GUTIÉRREZ-MARTÍN, C.B.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Removal of bacteria from boar semen using a low-density colloid. **Theriogenology**. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.028>

MUÑOZ-FUENTES, V.; FORSBERG, C. L.; VILÀ, C. MORRELL, J. M. Single-layer centrifugation separates spermatozoa from diploid cells in epididymal samples from gray wolves, *Canis lupus* (L.) **Theriogenology**, n.82, p. 773–776. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.029>

NÖTHLING, J. O.; SHUTTLEWORTH, R.; DE HAAS, K.; THOMPSON, P. N. Homologous prostatic fluid added to frozen–thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. **Theriogenology**, v. 64, p. 975–991. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.002>

NÖTHLING, J. O.; GERBER, D.; COLENBRANDER, B.; DIJKSTRA, M.; BAKKER, T.; DE CRAMER, K. The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed. **Theriogenology**, v. 67, p. 264–275. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000300015>

PENNACCHISAVI, P. A.; MOTHEO, T. F.; NAKAGHI, L. C. P.; BUTTLER, E. P.; VICENTE, W. R. R. Técnica modificada de compressão do ducto deferente e cauda do epidídimo para obtenção de espermatozoides caninos. **Revista Investigação Medicina Veterinária**, v. 14, n.1, p.1-7. 2015.

VALEANU, S. N.; DRUGOCIU, D. Biomimetic technologies - usefull tool in conservation of endagered species. *International Journal of Conservation Science*, v. 5, n. 3, p. 409-418. 2014.

VARESI, S.; VERNOCCHI, V.; MORSELLI, M. G.; LUVONI, G. C. DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa. **Reproductive biology**, v. 14, p. 257 – 261. 2014.

EFEITO DO FORMATO E GRAU DE INCLINAÇÃO DO TUBO DE MIGRAÇÃO, EM PROCEDIMENTO DE *SWIM-UP* MODIFICADO COM ADIÇÃO DE UM COLOIDE COMERCIAL, NO SÊMEN CANINO

RESUMO

Objetivou-se testar a eficiência da técnica de seleção espermática *swim-up* (SU) modificado com adição de um coloide (Androcoll-C™) (SU-AC), quando realizada em diferentes formatos e grau de inclinação do tubo de migração, na tentativa de aumentar as taxas de recuperação e a qualidade espermática em sêmen canino fresco. As amostras seminais (n = 15) foram obtidas de três cães. O sêmen foi diluído em diluente comercial, constituindo o controle (T0); foram avaliadas a cinemática espermática, defeitos espermáticos totais (DT), integridade de membrana plasmática (IMP) e integridade de membrana acrossomal (IMA). Posteriormente, o T0 foi dividido em 3 tratamentos: T1, SU-AC em tubo Falcon, em posição vertical; T2, SU-AC em tubo de base arredondada, em posição vertical e T3, SU-AC em tubo de base arredondada, posicionado a 45°. Para preparação do SU, em todos os tratamentos, 1 mL de T0 foi acrescido de 0,8 mL de AC e em seguida adicionado 1 mL de diluente comercial; três minutos após a montagem do tubo, 1 mL da superfície foi retirado para avaliação. No T2 e T3, após a retirada da alíquota para avaliação, 1 mL de meio foi repostado e avaliado 30 minutos depois, constituindo os tratamentos T2a e T3a, respectivamente. Assim como no T0, em todos os tratamentos foram avaliadas a cinemática espermática, DT, IMP e IMA; adicionalmente, foi calculada uma taxa de recuperação após os tratamentos com 3 min de incubação. Não houve diferenças nas taxas de recuperação espermática, DT, IMA e IMP entre os tratamentos ($P > 0,05$). Houve uma diminuição dos parâmetros cinéticos, independente do formato do tubo de migração e sua inclinação em relação ao T0 ($P < 0,05$). Em posição vertical o formato do tubo não influenciou nas avaliações seminais ($P > 0,05$). O SU-AC quando realizado em tubo de base arredondada inclinado teve um aumento nos valores da VSL, LIN, WOB em relação ao tubo em posição vertical (T2 vs T3) ($P < 0,05$), porém a integridade celular foi mantida nestes tratamentos. Foi observada apenas diminuição nos DT ($P < 0,05$)

quando o uso da inclinação do tubo na avaliação de 30 min após a renovação do meio (T3a). Não houve melhora dos parâmetros cinéticos avaliados após SU-AC, assim como nenhum efeito do formato e inclinação do tubo de migração nas taxas de recuperação espermática, DT, IMP e IMA.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as técnicas que visam melhorar a qualidade das amostras espermáticas podem ser citadas aquelas que separam os espermatozoides do plasma (tais como a centrifugação e filtração simples) e as que visam selecionar uma subpopulação de espermatozoides (gradientes de Percoll, filtração com lã de vidro, gradientes de albumina, *swim-up*: SU e centrifugação coloidal em camada única: SLC) (Berger et al., 1985; Günay et al., 2004; Bukowska et al., 2011; Morrell et al., 2016).

O SU é uma técnica amplamente utilizada previamente à aplicação de tecnologias de reprodução assistida, como fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e inseminação artificial (IA), para a melhoria das amostras espermáticas a serem utilizadas. O SU separa a subpopulação de espermatozoides móveis de um ejaculado, tendo como princípio a capacidade destes de migrar em forma ascendente em um meio até a superfície, afastando-se assim, do plasma seminal e outros componentes (Morrell, 2016). Além disso, alguns autores afirmam que os espermatozoides que migram no SU são geralmente superiores quanto à vitalidade, morfologia, estabilidade de membrana e integridade da cromatina, em relação à qualidade média do ejaculado original (Purvis & Egdetveit, 1993; Bukowska et al., 2011). Em humanos, Zini et al. (2000) demonstraram que a taxa de recuperação espermática alcançada por centrifugação em gradiente de densidade (usando Percoll) pode ser compatível com a alcançada usando SU, porém, Morrell et al. (2016) citam como desvantagem desta técnica o tempo requerido para sua execução (45 - 60 min).

A centrifugação em camada única (*single layer centrifugation* - SLC) é uma técnica que através de um coloide espécie-específico (Androcoll-C™ para cães) constituído por sílica revestida de glicidoxipropiltrimetoxissilano, também é utilizada na seleção de espermatozoides. Pesquisas realizadas com este coloide em distintas espécies (caninos: Dorado et al., 2013; lobo: Muñoz-Fuentes et al., 2014; bovinos:

Goodla et al., 2014; equinos: Morrell et al., 2016; felinos: Chatdarong et al., 2010; dromedário: Malo et al., 2018; suínos: Morrell et al., 2019) demonstraram algumas das suas atribuições; entre elas podem ser citadas: a seleção de espermatozoides de melhor qualidade (comparado com amostras sem seleção), levando em consideração: a cinemática espermática (aumenta o tamanho relativo das subpopulações de espermatozoides com maior PMOT), a seleção de espermatozoides morfolologicamente normais, com membranas íntegras e boa integridade de cromatina, a durabilidade dos espermatozoides quando armazenados, a diminuição da carga de patógenos no ejaculado (como o Circovirus Porcino tipo 2 e Arterite Viral Equina; sem efeito espermatotóxico, contribuindo para a diminuição da resistência antimicrobiana) e o efeito positivo na separação celular para sexagem de sêmen (Dorado et al., 2013; Urbano et al., 2013; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2016; Morrell et al., 2019).

O SU modificado utilizado no presente estudo foi testado previamente por Dorado et al. (2015) também em cães, mediante a adição de AC à amostra seminal diluída, para agir como filtro de seleção espermática utilizando para tal, um tubo de migração de base cônica em posição vertical, onde a amostra foi incubada durante 3' para ser posteriormente recuperada e avaliada. Os dados obtidos por estes autores demonstraram que o SU modificado (SU-AC) é semelhante à SLC, em termos de taxas de recuperação espermática, motilidade progressiva (PMOT), defeitos espermáticos totais (DT), integridade de membrana plasmática (IMP) e integridade de membrana acrossomal (IMA). Portanto, o SU-AC se apresenta como uma metodologia que pode ser considerada na seleção espermática de cães, devido à sua maior simplicidade e menor tempo requerido para sua realização, quando comparada com a SLC.

No presente trabalho, diferentes formatos e grau de inclinação do tubo de migração foram testados, na tentativa de aumentar a taxas de recuperação e qualidade espermática após o SU-AC em sêmen canino fresco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e comissão de ética

Os cães utilizados pertenciam ao biotério do Hospital Veterinário da Universidade de Córdoba, Espanha. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as leis espanholas para o bem-estar e experimentação animal.

2.2 Animais e coleta seminal

Quinze ejaculados (5 por animal) foram coletados por manipulação digital. As coletas seminais foram realizadas em três cães hígidos da raça Beagle, entre 3 e 8 anos de idade, sem histórico reprodutivo, seguindo um cronograma de coleta de duas vezes por semana para cada animal.

2.3 Avaliação seminal

O aspecto e o volume seminal foram aferidos em tubo calibrado. A concentração espermática foi determinada com fotômetro (SpermaCue; Minitub GmbH, Tiefenbach, Alemanha). O sêmen foi então diluído (50×10^6 espermatozoides/mL) em diluente comercial pré-aquecido (38 °C) à base de TRIS (Biladyl A; Minitub GmbH), constituindo o controle (T0). Foi retirada uma alíquota para a avaliação da cinemática espermática, defeitos espermáticos totais (DT), integridade de membrana plasmática (IMP) e integridade de membrana acrossomal (IMA).

2.4 Delineamento experimental

Foram testados diferentes formatos e inclinações do tubo de migração na técnica de SU modificado. Em todos os tratamentos seguiu-se o mesmo protocolo de preparação para o SU, onde o 1 mL de T0 de cada animal, foi acrescido de 0,8 mL de Androcoll-C™ (previamente equilibrado a temperatura ambiente: ± 22 °C / 30 min.) misturando-se com a amostra; imediatamente, foi adicionado gentilmente, 1 mL do diluente comercial evitando a mistura com a amostra, formando assim duas colunas no tubo; três minutos após a montagem, 1 mL da superfície foi retirado cuidadosamente para avaliação. Foram testadas 3 combinações de tubo, sendo o T1: SU-AC em tubo

Falcon, em posição vertical; T2: SU-AC em tubo de base arredondada (tamanho 12d x 120h, mm), em posição vertical e T3: SU-AC em tubo de base arredondada (12d x 120h, mm), posicionado a 45°.

Foi calculada a taxa de recuperação espermática após os tratamentos com 3 min de incubação; para isto, a concentração foi aferida e comparada com a concentração do T0. Assim como no T0, em todos os tratamentos foram avaliadas a cinemática espermática, DT, IMP e IMA. No T2 e T3, após a retirada da alíquota para avaliação, 1 mL de meio foi repostado e avaliado 30 minutos depois, constituindo os tratamentos T2a e T3a, respectivamente.

A motilidade espermática foi avaliada a partir de uma alíquota diluída (25×10^6 espermatozoides/mL), utilizando o sistema de análise espermática assistida por computador (CASA - Sperm Class Analyzer; Microptic SL, Barcelona, Espanha) para o sêmen canino. Em cada avaliação, duas gotas de 5 μ L de cada amostra de sêmen diluído, foram avaliadas usando um microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i; Nikon, Tokio, Japão) a 100x. Para cada gota avaliada, foram filmados três campos microscópicos aleatoriamente. Estruturas não identificadas como espermatozoides foram excluídas da análise, utilizando a função de reprodução.

Os parâmetros avaliados pelo CASA (Verstegen et al., 2002) foram: velocidade média da trajetória (VAP) $< 10 \mu\text{m s}^{-1}$ foram considerados sem motilidade, espermatozoides com VAP $> 65 \mu\text{m s}^{-1}$ foram considerados como rápidos, enquanto espermatozoides com desvio $< 25\%$ a partir de uma linha reta, foram considerados com motilidade linear. A cinemática espermática avaliada incluiu: motilidade total (MOT, %), motilidade progressiva (PMOT, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade linear progressiva (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade média da trajetória (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), linearidade (LIN, como VSL/VCL, %), retilinearidade (STR, como VSL/VAP, %), índice de oscilação ou *wobble* (WOB, como VAP/VCL, %), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz) e amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm).

Para a morfologia espermática (DT) foram preparados esfregaços corados com Diff-Quick (Medion Diagnostics AG, Düringen, Suíça) (Kim et al., 2010) e avaliados em microscopia de luz (Microscópio de Epifluorescência, MotiC®, Canadá). Foram contabilizadas pelo menos 200 células por lâmina para cálculo da porcentagem de espermatozoides morfologicamente anormais.

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (IMP) foi avaliada usando uma associação dos fluorocromos iodeto de propídio (IP) e laranja de acridina (AO) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha) de acordo com a metodologia descrita por Dorado et al. (2013). Foram analisados pelo menos 200 espermatozoides por lâmina em microscópio de epifluorescência (Olympus BX40; Olympus Optical Co. Ltd) usando um filtro U-ND25-2 (460–490 nm; Olympus Optical Co. Ltd). Os núcleos dos espermatozoides com membrana plasmática intacta, tiveram coloração verde com AO, enquanto aqueles com membrana danificada, coraram de vermelho com IP ou mostraram dupla coloração. Os resultados foram expressos como porcentagens de membrana intacta.

Para a avaliação da membrana acrossomal (IMA) foi usada a associação dos fluorocromos IP e isotiocianato de fluoresceína conjugada com a aglutinina do amendoim (*Arachis hypogaea*) (FITC-PNA) (Sigma Aldrich Chemie GmbH) como descrito por Dorado et al. (2013). Foram avaliados pelo menos 200 espermatozoides em microscópio de epifluorescência (Olympus BX40; Olympus Optical Co. Ltd) em aumento de 1000x. Os espermatozoides foram classificados em dois grupos: (1) espermatozoides com acrossoma intacto (IMA, a região acrossomal do espermatozoide exibindo fluorescência verde brilhante; IP negativo, FITC-PNA positivo) e (2) acrossoma reagido (fluorescência verde no segmento equatorial ou nenhuma coloração no acrossoma; IP positivo, FITC-PNA negativo). Espermatozoides exibindo uma imagem irregular de cor verde florescente na região acrossomal foram considerados como acrossoma reagido. Os valores foram expressos em porcentagem.

2.5 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M. Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico SAS (Version 9.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A normalidade dos dados foi avaliada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Como os dados reportados neste estudo foram distribuídos normalmente, os parâmetros de qualidade seminal foram analisados por meio de modelos de efeitos lineares mistos. One-way ANOVA seguido por teste de gama múltipla de Duncan foi usado para avaliar as médias da taxa de recuperação dos diferentes tratamentos. O nível de significância foi estabelecido em $\alpha = 0,05$.

3. RESULTADOS

Os ejaculados utilizados neste experimento ($n = 15$) estiveram dentro dos padrões normais para a espécie (CBRA, 2013), apresentando as seguintes características: volume (fração espermática) $1,47 \pm 0,49$ mL ($0,7 - 2,5$ mL); concentração de espermatozoides $468,28 \pm 214,91 \times 10^6$ espermatozoides / mL ($174 - 954 \times 10^6$ espermatozoides / mL).

Não houve diferenças nas taxas de recuperação espermática ($P > 0,05$) entre os tratamentos avaliados (Tabela 1). Independente do formato do tubo de migração e sua inclinação, foi evidenciado para a maioria dos parâmetros cinéticos avaliados, diminuição dos seus valores em relação ao T0. Para ALH e BCF não foram observadas variações significativas nos valores. Ainda independente do tratamento realizado, na porcentagem de DT, IMA e IMP não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) (Tabela 2).

Em posição vertical o formato do tubo (T1 vs T2) não mostrou diferenças ($P > 0,05$) para nenhuma das avaliações realizadas. Com relação à inclinação do tubo de base arredondada (T2 vs T3) apenas o VSL, LIN, WOB apresentaram aumento dos valores cinéticos do tubo inclinado em relação ao tubo em posição vertical ($P < 0,05$) para a maioria de parâmetros de motilidade quando avaliados aos 3'. A integridade celular foi mantida no T2 e T3 (Tabela 2).

Ainda quanto à inclinação do tubo de base arredondada quando avaliados 30 minutos após a renovação do meio, apenas para DT foi observada uma diminuição ($P < 0,05$) quando o uso da inclinação do tubo (Tabela 3).

Tabela 1. Cinética espermática e taxa de recuperação de sêmen canino após coleta e após técnica de *swim-up* modificado com adição do colóide Androcoll-C™.

Parâmetro	T0	T1	T2	T3
Taxa de recuperação espermática	-	41,46 ± 6,01	37,15 ± 5,33	38,91 ± 6,44
MOT^A	78,65 ± 3,33 ^a	66,44 ± 3,48 ^b	58,15 ± 5,41 ^b	66,77 ± 3,88 ^b
PMOT^B	47,14 ± 3,61 ^a	34,16 ± 4,21 ^b	25,43 ± 4,53 ^b	34,18 ± 3,85 ^b
VCL	87,41 ± 3,49 ^a	78,55 ± 4,79 ^{ab}	73,03 ± 6,0 ^b	79,20 ± 4,07 ^{ab}
VSL	62,07 ± 2,81 ^a	47,84 ± 4,58 ^{bc}	39,37 ± 4,59 ^c	50,36 ± 4,24 ^b
VAP	70,5 ± 2,83 ^a	57,92 ± 4,38 ^b	50,49 ± 4,11 ^b	60,74 ± 3,96 ^{ab}
LIN	70,60 ± 2,08 ^a	60,21 ± 3,35 ^{bc}	52,08 ± 3,74 ^c	62,75 ± 3,22 ^{ab}
STR	86,29 ± 1,23 ^a	80,80 ± 2,49 ^{ab}	75,31 ± 2,89 ^b	81,48 ± 2,18 ^{ab}
WOB	82,33 ± 1,62 ^a	73,75 ± 2,77 ^{bc}	68,09 ± 2,60 ^c	76,39 ± 2,33 ^{ab}
ALH	3,6 ± 0,19	4,15 ± 0,21	4,00 ± 0,32	4,34 ± 0,18
BCF	9,29 ± 0,47	8,08 ± 0,29	7,37 ± 0,47	8,44 ± 0,29

Valores médios (± S.E.M.)^{a-c} Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan. ^AA motilidade total é definida pela porcentagem de espermatozoides com velocidade média $> 10 \mu\text{m s}^{-1}$; ^Ba motilidade progressiva é definida como a porcentagem de espermatozoides com velocidade média $> 65 \mu\text{m s}^{-1}$ e retilinearidade $> 75\%$. Taxa de recuperação espermática (%); MOT: motilidade total (%); PMOT motilidade progressiva (%); VCL: velocidade curvilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL: velocidade linear progressiva ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP: velocidade média da trajetória ($\mu\text{m s}^{-1}$); LIN: linearidade (VSL/VCL, %); STR: retilinearidade (VSL/VAP, %); WOB índice de oscilação ou wobble (VAP/VCL, %); BCF: frequência de batimento flagelar cruzado (Hz); ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm). T0: sêmen fresco diluído em diluente comercial; T1: sêmen submetido à técnica de SU-AC em tubo Falcon em posição vertical avaliado aos três minutos; T2: sêmen submetido à técnica de SU-AC em tubo de base arredondada em posição vertical avaliado aos três minutos; T3: sêmen submetido à técnica de SU-AC em tubo de base arredondada posicionado a 45° avaliado aos três minutos.

Tabela 2. Morfologia espermática, integridade acrossomal e integridade de membrana plasmática de sêmen canino após coleta e após técnica de *swim-up* modificado com adição do coloide Androcoll-C™.

Parâmetro	T0	T1	T2	T3
DT	15,50 ± 2,03	18,10 ± 2,08	15,32 ± 1,92	17,39 ± 2,77
IMA	67,71 ± 4,65	76,71 ± 2,90	70,42 ± 2,56	77,92 ± 2,78
IMP	78,52 ± 3,93	82,89 ± 2,31	75,10 ± 4,56	80,64 ± 4,79

Valores médios (± S.E.M.). Sem diferenças significativas ($P > 0,05$) pelo teste de Duncan. DT: defeitos espermáticos totais (%); IMA: espermatozoides com acrossoma intacto (%); IMP: membrana intacta (%). T0: sêmen fresco diluído em diluente comercial; T1: sêmen submetido à técnica de SU-AC em tubo Falcon em posição vertical avaliado aos três minutos; T2: sêmen submetido à técnica de SU-AC em tubo de base arredondada em posição vertical avaliado aos três minutos; T3: sêmen submetido à técnica de SU-AC em tubo de base arredondada posicionado a 45° avaliado aos três minutos.

Tabela 3. Motilidade e integridade espermática de sêmen canino em amostras residuais com reposição de diluente avaliadas após trinta minutos de *swim-up* modificado com adição do coloide Androcoll-C™, em tubos de base arredondada posicionados verticalmente e inclinado.

Parâmetro	T2a	T3a
MOT^A	55,92 ± 4,58	55,46 ± 5,08
PMOT^B	22,32 ± 4,62	21,26 ± 3,99
DT	23,71 ± 2,66 ^a	17,14 ± 3,10 ^b
IMA	66,00 ± 3,63	69,64 ± 4,09
IMP	69,40 ± 5,70	77,27 ± 3,50

Valores médios (± S.E.M.). ^{a-b} Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan. ^AA motilidade total é definida pela porcentagem de espermatozoides com velocidade média $> 10 \mu\text{m s}^{-1}$; ^Ba motilidade progressiva é definida como a porcentagem de espermatozoides com velocidade média $> 65 \mu\text{m s}^{-1}$ e retilinearidade $> 75\%$. MOT: motilidade total (%); PMOT motilidade progressiva (%); DT: defeitos espermáticos totais (%); IMA: espermatozoides com acrossoma intacto (%); IMP: membrana intacta (%). T2a: sêmen submetido à técnica de SU-AC em tubo de base arredondada em posição vertical com reposição de diluente comercial aos três minutos e avaliação aos trinta minutos; T3a: sêmen submetido à técnica de SU-AC em tubo de base arredondada posicionado a 45° com reposição de diluente comercial aos três minutos e avaliação aos trinta minutos.

4. DISCUSSÃO

O SU modificado utilizado no presente trabalho foi testado previamente por Dorado et al. (2015) também em cães, adicionando AC à amostra seminal diluída, para agir como filtro de seleção espermática. Estes autores realizaram a técnica em tubo Falcon a 22 °C em posição vertical por 3 min, comparando a qualidade seminal obtida com a SLC; comprovando que estes procedimentos são semelhantes em termos de taxas de recuperação espermática, PMOT, DT, IMA e IMP. Neste sentido, Gálvez et al. (2015) usando a SLC prévia ao congelamento de sêmen canino obtiveram 43,6 % de taxa de recuperação espermática, semelhante ao observado no presente experimento com o uso de SU-AC (Tabela 1).

Na tentativa de aumentar as taxas de recuperação espermática é factível a hipótese de que o uso de um tubo de formato arredondado, ao invés do tubo de formato cônico (Falcon), poderia apresentar melhorias nos resultados após o SU modificado, uma vez que a distância do fundo do tubo até a superfície de interface é diminuída. Assim, foram testados no presente estudo a influência do formato do tubo, na qualidade das amostras; no entanto, considerando esta variável, os resultados foram similares entre os tratamentos 1 e 2 (tubo Falcon e tubo de fundo arredondado em posição vertical, respectivamente) para as taxas de recuperação e demais avaliações espermáticas realizadas ($P>0,05$) (Tabela 1) sugerindo que o SU-AC poderia ser realizado indistintamente em ambos os formatos de tubos. Também quanto à inclinação do tubo Purvis & Egdetveit, (1993) relatam que em humanos, as tecnologias de reprodução assistida são comumente praticadas em indivíduos com alterações reprodutivas. Estas alterações são caracterizadas por baixas concentrações espermáticas, alta proporção de espermatozoides anormais e baixa motilidade; esses aspectos, fazem com que as taxas de recuperação e a qualidade dos espermatozoides tenham alta relevância nas técnicas de seleção. Desta maneira, estes autores testaram a influência de algumas variáveis para otimizar o SU, dentre elas: a temperatura, o tempo de incubação e a área de interface entre os dois líquidos da preparação. A inclinação do tubo é um procedimento usado na rotina do SU por alguns autores (Zini et al., 2000). Purvis & Egdetveit, (1993) observaram que ao realizar a inclinação do tubo de migração durante o SU, a recuperação espermática pode atingir entre 50 a 100

% a mais em relação ao tubo posicionado verticalmente. No presente experimento, a inclinação em 45 ° do tubo de base redonda não apresentou diferença ($P < 0,05$) quanto a taxa de recuperação espermática (Tabela 1).

O CASA vem sendo apontado como uma importante ferramenta na área de reprodução (Verstegen et al., 2002), uma vez que os parâmetros de movimento calculados têm sido identificados como marcadores de qualidade espermática (Dorado et al., 2011) e como bons indicadores da capacidade fertilizante (Hirano et al., 2001). No presente experimento, o SU-AC independente da inclinação e formato do tubo, preservou apenas os valores para ALH e BCF, com diminuição dos demais valores avaliados (Tabela 1). Ambos estes parâmetros (ALH e BCF) indicam o vigor do movimento flagelar, que está relacionado por sua vez, à fertilização *in vitro* e *in vivo*, permitindo ao espermatozoide progredir através do muco cervical e da zona pelúcida do ovócito (Jeulin et al., 1996; Hirano et al., 2001; Verstegen et al., 2002).

No presente trabalho, ao avaliar o efeito da inclinação nos tubos de formato redondo (T2 vs. T3), apenas foram observadas aumento para VSL, LIN, WOB no tubo inclinado, enquanto os parâmetros de VCL e a VAP não diferiram ($P > 0,05$). Holt et al. (1994) descrevem que a VCL e a VAP estão relacionados com a capacitação espermática, com aumento diretamente proporcional com taxas de FIV.

A avaliação de um parâmetro cinético não oferece por si só fundamento suficiente para prever a fertilidade, sendo por tanto necessárias avaliações de diferentes compartimentos celulares, que possam levar a uma melhor conclusão sobre a qualidade da amostra (Verstegen et al., 2002). Para tal, no presente estudo, a integridade celular definida pelos DT, IMA e IMP, foi preservada em todos os tratamentos independente do formato e da inclinação do tubo de migração (Tabela 2), porém, Bukowska et al. (2011) observaram que amostras de sêmen de cães apresentam maior viabilidade quando recuperadas em até 15 min de SU. No presente estudo, amostras residuais avaliadas após 30 min de SU-AC, apresentaram maior porcentagem de patologias espermáticas quando incubadas no tubo de migração na posição vertical (Tabela 3), sendo que os demais parâmetros avaliados, não apresentaram alteração ($P > 0,05$). Gálvez et al. (2015) e Ortiz et al. (2015) sugerem que o uso da SLC apresentaria maior relevância quando aplicada em amostras seminais de baixa qualidade. Assim, no presente estudo, com o uso de amostras seminais de boa qualidade o SU-AC não foi eficiente na seleção de amostras superiores,

independentemente do formato e inclinação do tubo de migração. Sugere-se que novas pesquisas sejam realizadas com uso de sêmen de qualidade inferior, que possam apresentar melhores níveis de seleção espermática.

A simplicidade do SU-AC, o baixo custo e a rapidez justificam a pesquisa de novas propostas metodológicas, que visem incrementar as taxas de recuperação espermática e selecionar células de boa qualidade, aspectos de grande importância para a reprodução, principalmente para aqueles indivíduos cuja qualidade seminal é inferior (Purvis & Egdetveit, 1993).

5. CONCLUSÃO

Não há melhora dos parâmetros cinéticos avaliados após a técnica de *swim-up* com adição do coloide Androcoll-CTM usado como filtro de seleção espermática em sêmen canino fresco de boa qualidade;

As taxas de recuperação espermática, assim como a integridade celular, não são influenciadas pelo uso de tubos de migração de diferentes formatos e inclinação durante a realização da técnica de *swim-up* modificado;

O *swim-up* modificado quando realizado em tubo de migração de base arredondada e inclinado, com recuperação e avaliação aos 3 minutos, proporciona melhores valores para VSL, LIN, WOB em relação ao tubo de base arredondada posicionado verticalmente;

A técnica de *swim-up* modificado com adição de Androcoll-CTM permite a obtenção de um número menor de patologias espermáticas, quando realizado em tubo de migração de base arredondada e inclinado, com renovação do meio no tubo de migração com recuperação e avaliação aos 30 minutos.

6. REFERÊNCIAS

BERGER, T.; MARRS, R. P.; MOYER, D. L. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 43, n. 2. 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)48384-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)48384-6)

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinärer Medicin**, v. 25, n. 7, p. 383-391. 1973.

BUKOWSKA, D.; KEMPISTY, B.; SIKORA, J.; JACKOWSKA, M.; WOZNA, M.; ANTOSIK, P.; PIOTROWSKA, H.; BUDNA, J.; JASKOWSKI, J. M. The effect of swim-up purification and incubation of cells on sperm viability in dogs of different ages. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 5, p.248–254. 2011. DOI: 10.17221/1560-VETMED

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA, 104p. 2013.

CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; MORRELL, J. M. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 1284–1292. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.009>

DORADO, J.; RIJSSELAERE, T.; MUÑOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. Influence of sampling factors on canine sperm motility parameters measured by the Sperm Class Analyzer. Systems. **Biology in Reproductive Medicine**, v. 57, p. 318–325. 2011. DOI: 10.3109/19396368.2011.627081

DORADO, J.; GÁLVEZ, M. J.; MORRELL, J. M.; ALCARÁZ, L.; ORTIZ, I.; ACHA, D.; HIDALGO, M. Use of Single Layer Centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. **Theriogenology in press**, v. 80, p. 955–962. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.027>

DORADO, J.; GÁLVEZ, M. J.; DEMYDA-PEYRÁS, S.; ORTIZ, I.; MORRELL, J. M.; CRESPO, F.; GÓSSALVEZ, J.; HIDALGO, M. Differences in preservation of canine chilled semen using simple sperm washing, single-layer centrifugation and modified swim-up preparation techniques. **Reproduction Fertility and Development**. v. 28, n.10. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD15071>

GÁLVEZ, M. J.; ORTIZ, I.; HIDALGO, M.; MORRELL, J. M.; DORADO, J. Should single layer centrifugation of dog semen be done before or after the semen is cooled? **Vet Rec.**, v. 176, n.14, p. 359. 2015. DOI: [10.1136/vr.102806](https://doi.org/10.1136/vr.102806)

GOODLA, L.; MORRELL, J. M.; YUSNIZAR, Y.; STÅLHAMMAR, H.; A. JOHANNISSON. Quality of bull spermatozoa after preparation by single-layer centrifugation. **J. Dairy Sci.**, v. 97, p. 2204–2212. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7607>

GÜNAY, Ü.; NUR, Z.; SOYLU, M. K. Effect of glass wool filtration method on frozen-thawed dog semen. **Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.**, v. 23, n.1-2-3, p.9-14. 2004.

HIRANO, Y.; SHIBAHARA, H.; OBARA, H.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, S.; YAMAGUCHI, C.; TSUNODA, H.; SATO, I. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. **J Assist Reprod Genet.**, v. 18, n. 4, p. 213-8. 2001. DOI: [10.1023/A:1009420432234](https://doi.org/10.1023/A:1009420432234)

HOLT, W.; WATSON, P.; CURRY, M.; HOLT, C. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. **Fertility and Sterility**, v. 62, n. 6. 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)57201-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57201-X)

JEULIN, C.; LEWIN, L. M.; CHEVRIER, C.; SCHOEVAERT- BROSSAULT, D. Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: Manual and computer- aided image analysis. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 35, p. 147-161. 1996. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1996\)35:2<147::AID-CM7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1996)35:2<147::AID-CM7>3.0.CO;2-7)

KIM, S.-H.; YU, D.-H.; KIM, Y.-J. Apoptosis-like change, ROS and DNA status in cryopreserved canine spermatozoa recovered by glass-wool filtration and Percoll-gradient centrifugation techniques. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 119, n. 1–2, p. 106–114. 2010. DOI:10.1016/J.ANIREPROSCI.2009.11.002

MALO, C.; CRICHTON, E. G.; MORRELL, J. M.; PUKAZHENTHI, B. S.; JOHANNISSON, A.; SPLAN, R.; SKIDMORE, J. A. Colloid centrifugation of fresh semen improves post-thaw quality of cryopreserved dromedary camel spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 192, p. 28-34. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.005>

MORRELL, J. M. **Artificial Insemination: Current and Future Trends, Artificial Insemination in Farm Animals**. Ed. Dr. Milad Manafi, ISBN: 978-953-307-312-5, InTech, 2011. DOI: 10.5772/17943. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-current-and-future-trends>. Acesso em: 02 de outubro de 2018.

MORRELL, J. M.; ALSINA, M. S.; ABRAHAM, M. C.; SJUNNESSON, Y. Practical applications of sperm selection techniques for improving reproductive efficiency. **Anim. Reprod.**, v.13, n. 3, p.340-345. 2016. DOI: 10.21451/1984-3143-AR876.

MORRELL, J. M.; NÚÑEZ-GONZÁLEZ, A.; CRESPO-FÉLEZ, I.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, S.; MARTÍNEZ ALBORCIA, M. J.; FERNÁNDEZ-ALEGRE, E.; DOMINGUEZ, J.C.; GUTIÉRREZ-MARTÍN, C.B.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Removal of bacteria from boar semen using a low-density colloid. **Theriogenology**. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.028>

MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. **The Open Andrology Journal**, v. 1, p. 1-9. 2009.

MORRELL, J.M. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloid Centrifugation of Semen: Applications in Assisted Reproduction. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 7, p. 597-610. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2016.78055>

MUÑOZ-FUENTES, V.; FORSBERG, C. L.; VILÀ, C. MORRELL, J. M. Single-layer centrifugation separates spermatozoa from diploid cells in epididymal samples from gray wolves, *Canis lupus* (L.) **Theriogenology**, n.82, p.773–776. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.029>

ORTIZ, I.; DORADO, J.; MORRELL, J. M.; CRESPO, F.; GOSÁLVEZ, J.; GÁLVEZ, M. J.; ACHA, D.; HIDALGO, M. Effect of single-layer centrifugation or washing on frozenthawed donkey semen quality: do they have the same effect regardless of the quality of the sample? **Theriogenology**, v. 84, p. 294–300. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.021>

PURVIS, K.; EGDETVEIT, I. Factors Affecting Sperm Yield During Swim-Up. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 10, n. 2, p. 145-150. 1993. DOI: [10.1007/BF01207738](https://doi.org/10.1007/BF01207738)

URBANO, M.; DORADO, J.; ORTIZ, I.; MORRELL, J.M.; DEMYDA-PEYRÁS, S.; GÁLVEZ, M. J.; ALCARAZ, L.; RAMÍREZ, L.; HIDALGO, M. Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test. **Anim Reprod Sci.**, v. 143, n. 1-4, p. 118-25. 2013. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.10.005

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer Assisted Semen Analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1)

ZINI, A.; FINELLI, A.; PHANG, D.; JARVI, K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. **Urology**, v. 56, n. 6, p. 1081-4. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01495-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01495-3)

EFEITO DO FLUÍDO PROSTÁTICO NA VIABILIDADE DE AMOSTRAS ESPERMÁTICAS EPIDIDIMÁRIAS DE CÃES DOMÉSTICOS REFRIGERADAS, UTILIZANDO DIFERENTES DILUIDORES

RESUMO

Objetivou-se verificar o efeito da adição de fluido prostático em amostras espermáticas epididimárias de cão doméstico resfriadas entre 4 – 6 °C por 24 horas obtidas através da técnica de fluxo retrogrado com uso de meio comercial ou soro fisiológico. Para a obtenção das amostras espermáticas epididimárias (AEEs) foram processados 8 pares de conjuntos testículo-epidídimo, sendo estes lavados, pesados e dissecados antes da recuperação espermática. Em cada animal as AEEs foram obtidas a partir da canulação do ducto deferente, com o uso de seringa e agulha hipodérmica, e promoção de um fluxo retrógrado (FR) com adição de ar. As AEEs obtidas com uso de meio de manutenção comercial (MM) (Nutricell®) foram padronizadas para 50 x 10⁶ de espermatozoides por mL em MM e constituíram o T1. As amostras coletadas com soro fisiológico (SF) foram subdivididas em três alíquotas, sendo uma ajustada para 50 x 10⁶ de espermatozoides por mL em SF, constituindo o T2; outra alíquota foi ajustada para 50 x 10⁶ de espermatozoides por mL com MM acrescido de 10 % de SF, constituindo o T3; a terceira alíquota foi ajustada para 50 x 10⁶ de espermatozoides por mL com MM acrescido de 10 % de FP constituindo o T4. Os tratamentos foram submetidos a resfriamento em refrigerador convencional entre 4 - 6 °C por 24 horas. Após esta etapa foi realizada a avaliação da motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), morfologia espermática, integridade funcional da membrana plasmática e teste de termorresistência (TTR). Não houve efeito ($P>0,05$) do MM ou do SF após coleta, na quantidade e qualidade dos espermatozoides recém coletados; porém, a preservação das amostras em presença de MM durante o resfriamento, influenciou favoravelmente ($P<0,05$) na MOT, VIG e longevidade das amostras. No entanto, a integridade funcional da membrana plasmática e as patologias espermáticas não mostraram diferenças ($P>0,05$) após resfriamento. Ao avaliar isoladamente a influência da adição 10 % de FP ao MM, não foram observadas diferenças ($P>0,05$)

em todos os parâmetros avaliados. Assim, o FR pode ser realizado mediante perfusão de SF ou MM e adição de ar, para a recuperação de AEEs, sem alteração da qualidade imediata da amostra; as amostras armazenadas em MM oferecem melhores características espermáticas após 24 horas de resfriamento; a adição de 10 % de fluido prostático ao meio de manutenção para armazenamento de amostras espermáticas epididimárias caninas sob refrigeração por 24 horas não melhora os parâmetros espermáticos.

1. INTRODUÇÃO

O epidídimo é o local onde os espermatozoides amadurecem e são armazenados até o momento da ejaculação. A passagem dos espermatozoides nas diferentes regiões epididimárias permite que ocorram mudanças celulares importantes que levam ao desenvolvimento da motilidade e da capacidade de fertilização dos espermatozoides, culminando com o seu armazenamento na cauda do epidídimo (Jegou et al., 2000; Knobil & Neill's, 2006).

Em humanos, várias técnicas são utilizadas para a obtenção de espermatozoides *in vivo* diretamente do testículo ou epidídimo, dentre elas: a aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA); a aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo (MESA); a aspiração percutânea de espermatozoides do testículo (TESA); e a extração de espermatozoides (TESE) (Hewitson et al., 2002; SBU, 2012).

Em animais domésticos e silvestres, as coletas epididimárias acontecem com maior frequência após castração ou óbito, com o objetivo de compor germoplasmas de espécies em ameaça de extinção ou para conservação do material genético de espécimes de alto valor comercial, possibilitando sua utilização imediata ou futura em programas de reprodução assistida (Assumpção et al., 2016; Prapaiwan et al., 2016; Benítez et al., 2018). Dentre as várias metodologias propostas observam-se: a fragmentação e flutuação da cauda do epidídimo (felino: Chatdarong et al., 2010; canino: Bergo, 2018); compressão da cauda do epidídimo com pinça hemostática ou lâmina de vidro (canino: Pennacchisavi et al., 2015); fístula cirúrgica (rato: Gilmore et al., 1971) e a perfusão por fluxo retrógrado (FR) do ducto deferente e cauda do

epidídimo (veado: Martinez-Pastor et al., 2006; canino: Batista et al., 2016; bovino: Benítez et al., 2018; equinos: Ellerbrock et al., 2017). Assim, a escolha da técnica a ser utilizada nesse tipo de procedimento deve ser baseada considerando-se os recursos logísticos, tempo disponível e mesmo a familiaridade do manipulador com a mesma (Bergo, 2018).

O plasma seminal apresenta como funções: o fornecimento de energia para os espermatozoides; a manutenção da pressão osmótica; a quelação de íons livres de cálcio; o efeito tampão; a imunossupressão no trato genital feminino; e a regulação da motilidade dos espermatozoides (Noakes, 2006). Em cães, a próstata é a principal glândula acessória aos órgãos reprodutores masculinos, assim o plasma seminal nessa espécie é constituído basicamente pelo fluido prostático (FP), o qual é secretado especialmente, e em grande quantidade proporcional, no final do processo ejaculatório; portanto, espermatozoides coletados diretamente da cauda do epidídimo não entram em contato com o FP (Hori et al., 2015). De forma semelhante, a coleta de sêmen canino é bem caracterizada pela ejaculação em três frações distintas, sendo a primeira e terceira de origem prostática e a segunda de origem epididimária (Noakes, 2006), neste sentido é possível, ao isolar a fração rica em espermatozoides durante a coleta manual, a obtenção de espermatozoides sem contato com o FP. O efeito da adição de FP tem sido testada em diferentes protocolos de conservação de sêmen de cães, mesmo a partir de coleta ejaculatória, visando melhorar a cinemática espermática (Korochkina et al., 2014), bem como a diminuição de patologias espermáticas (Nöthling et al. 2007) e aumento das taxas de concepção após inseminação artificial (IA) (Nöthling et al., 2005; Hori et al., 2015). Desta forma, o intuito do presente trabalho foi verificar o efeito da adição de fluido prostático em amostras espermáticas epididimárias de cão doméstico, obtidas por meio da técnica de fluxo retrógrado epididimário.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e comissão de ética

As coletas e análises das amostras espermáticas epididimárias (AEEs) foram feitas conjuntamente no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Animais Selvagens (REPAAS) e no Laboratório de Andrologia Animal (LAA) da UFV. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (protocolo n° 11/2015).

2.2 Animais

Testículos e epidídimos foram obtidos como material de descarte de castrações eletivas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa e do programa de castração da Sociedade Viçosense de Proteção aos Animais (SOVIPA). Segundo as informações coletadas por meio das fichas clínicas, os animais apresentaram idade entre 1 e 4 anos, pesando entre 15 e 28 Kg e sem raça definida (SRD).

Oito pares de conjuntos testículo-epidídimo-ducto deferente, ligados individualmente com sutura para evitar extravasamento das AEEs, foram transportados imediatamente após a cirurgia para o REPAAS, em solução salina (NaCl 0,9 %) a temperatura ambiente (± 25 °C). Posteriormente, foram lavados com solução salina e o epidídimo seccionado na transição cauda – corpo, sendo o ducto deferente limitado ao tamanho total do epidídimo. Cada testículo e cauda de epidídimo (anexados ao respectivo ducto deferente) foi pesado individualmente. As caudas dos epidídimos foram novamente lavadas com solução salina aquecida (37 °C), dissecadas (removendo os vasos sanguíneos aderentes à superfície) para diminuir a contaminação com sangue.

2.3 Obtenção das amostras espermáticas epididimárias

As caudas dos epidídimos foram acondicionadas em placas de Petri para realizar a recuperação espermática pela técnica de perfusão com fluxo retrógrado (FR). Para cada animal, em uma cauda de epidídimo foi realizado o FR com meio de manutenção comercial (MM) (TRIS-CITRATO: 24g/L de TRIS, 14 g/L de ácido

cítrico, 8 g/L de glicose, 2 g/L de amicacina, 200 g/L de gema de ovo; Nutricell[®], SP-Brasil) e para a outra cauda de epidídimo o FR foi realizado com soro fisiológico (SF).

Para realização da técnica de FR, o ducto deferente foi canulado por meio de uma agulha hipodérmica descartável estéril de pequeno calibre (BD[®] 0,45x13 mm, 26G), acoplada a uma seringa descartável estéril de 3 mL de capacidade, contendo 1 mL do MM ou SF e 1 mL de ar (Silva et al., 2018). Foi então promovido fluxo lento, no sentido da cauda do epidídimo. Todo o conteúdo coletado foi aspirado e mensurado, utilizando pipeta automática, depositado em tubo plástico com capacidade de 1,5 mL e mantido em banho-maria a 37 °C para a realização das avaliações espermáticas. Nas AEEs de cada cauda de epidídimo foi aferida a concentração espermática por mL em câmara de Neubauer seguindo a técnica corriqueira (CBRA, 2013).

A qualidade das AEEs coletadas em cada animal foi determinada imediatamente após a recuperação epididimária pelo mesmo avaliador, mediante avaliação da motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), morfologia espermática e integridade funcional da membrana plasmática.

2.4 Avaliação das amostras espermáticas epididimárias

Para avaliação da MOT (%) e do VIG (1 – 5) foi depositada uma alíquota de 10 µL da amostra em lâmina de vidro preaquecida, coberta por lamínula e imediatamente avaliada em microscópio óptico em aumento de 400 x. A avaliação foi feita em, no mínimo, cinco campos aleatórios da lâmina.

A morfologia espermática foi avaliada a partir de um preparado contendo 30 µL da amostra espermática em 1 mL de formol-salina tamponada (Hancock, 1957). As análises foram feitas por meio de preparação úmida em microscópio de contraste de fase (Olympus[®] - BX41) em aumento de 1000 x (sob gota de óleo de imersão). Foram contadas 200 células de cada amostra espermática e classificadas em defeitos maiores, menores e totais segundo Blom (1973).

Para a determinação da integridade funcional da membrana plasmática a partir do teste hiposmótico (HOST) foram homogeneizados em tubos plásticos com capacidade de 1,5 mL uma alíquota de 20 µL da AEE em 1 mL água destilada (*water test*) e incubados em seguida por 30 minutos em banho-maria a 37 °C (Carazo et al., 2014). Após o período de incubação, foram adicionados 0,5 mL de uma solução de formol-salina tamponada (Hancock, 1957) para fixação e avaliação. Foram avaliadas

100 células em microscópio de contraste de fase em aumento de 1000 x (sob gota de óleo de imersão). Foram consideradas reativas ao teste todas aquelas células que apresentaram enrolamento ou dobra de cauda e o resultado final foi determinado pela subtração das caudas alteradas antes do teste (valores registrados na avaliação morfológica) (Melo & Henry, 1999).

2.5 Delineamento experimental

As AEEs obtidas com uso de MM foram padronizadas para 50×10^6 de espermatozoides por mL em MM e constituíram o T1 (MM). Aquelas amostras coletadas com SF, foram subdivididas em três alíquotas, sendo uma ajustada para 50×10^6 de espermatozoides por mL em SF, constituindo o T2 (SF); outra alíquota foi ajustada para 50×10^6 de espermatozoides por mL com MM acrescido de 10 % de SF, constituindo o T3 (MM-SF); a terceira alíquota foi ajustada para 50×10^6 de espermatozoides por mL com MM acrescido de 10 % de FP constituindo o T4 (MM-FP).

2.6 Obtenção do fluido prostático

Para obtenção do fluido prostático (FP) foram realizadas coletas manuais em 4 cães saudáveis (1 ejaculado por animal), de raças variadas em idade entre 3 e 5 anos, com parâmetros seminais normais (motilidade > 70 % e < 30 % de patologias espermáticas totais). Na coleta do ejaculado em cada animal foi eliminada a fração rica em espermatozoides e coletada apenas a fração de FP, que foi ainda centrifugada individualmente a 700 x g durante 10 minutos, coletando-se então o sobrenadante de cada amostra e misturando o de todos os animais para formar um pool, o qual foi devidamente homogeneizado em agitador (Vortex Mixer - Xh-C Coleman). Posteriormente, foi armazenado em tubos plásticos com capacidade de 1,5 mL a -20 °C até seu uso.

2.7 Resfriamento

Após a rediluição, todos os tratamentos foram mantidos em refrigerador convencional entre 4 - 6 °C por 24 horas (resfriamento *ex situ*). Após este período, cada tratamento foi transferido e mantido em banho maria a 37 °C durante 10 minutos para estabilização e avaliado quanto à MOT, VIG, morfologia espermática e

integridade funcional da membrana plasmática, e a cada 15 minutos foram avaliadas a MOT e o VIG como TTR durante 90 minutos.

2.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo Statistical Analysis System (SAS, 2002). Os dados em percentagem foram submetidos à transformação angular ($Y' = \arcsen(\sqrt{Y})$) e analisados por ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. O vigor espermático foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$. Foram realizadas análises de correlação entre os pesos corporais, conjuntos testículo-epidídimo e conjuntos cauda de epidídimo-duto deferente com o número total de espermatozoides recuperados, em software Microsoft Excel® 2016.

3. RESULTADOS

O peso médio corporal nos animais estudados foi de $19,3 \pm 4,3$ kg, o peso médio dos conjuntos testículo-epidídimo foi $15,4 \pm 4,5$ g e o peso médio dos conjuntos cauda de epidídimo-duto deferente foi $1,1 \pm 0,3$ g. Não foram observadas diferenças entre as medias dos pesos dos conjuntos testículo-epidídimo direito em relação ao esquerdo, nem dos conjuntos cauda de epidídimo-duto deferente direito em relação ao esquerdo ($P > 0,05$). Independente da solução utilizada para a obtenção das amostras por fluxo retrógrado, o número total de espermatozoides recuperados apresentou alta correlação com o peso corporal ($r = 0,80$), com os pesos dos conjuntos testículo-epidídimo ($r = 0,83$) e com o peso dos conjuntos cauda de epidídimo-duto deferente ($r = 0,60$).

No presente experimento não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) nos parâmetros analisados quanto ao tipo de solução utilizada para recuperação espermática pela técnica de FR, nesse sentido o número total de espermatozoides e a concentração por mL em AEEs foram semelhantes, assim como os demais dados qualitativos analisados ($P > 0,05$) (Tabela 1). Porém, a preservação das amostras em presença de MM, durante o resfriamento, influenciou favoravelmente na MOT e no VIG ($P < 0,05$) na longevidade das amostras (Figura 1 e 2).

Tabela 1. Parâmetros espermáticos de amostras epididimárias de cães após coleta com meio comercial ou soro fisiológico.

Parâmetro	Soluções de coleta	
	MM	SF
Espermatozoides totais	606,2 ± 514,0 (84,8)	706,0 ± 662,5 (93,8)
CONC	650,2 ± 531,4 (81,7)	756,4 ± 724,2 (95,7)
MOT	84,4 ± 5,0 (5,9)	77,5 ± 13,9 (17,9)
VIG*	4,4 ± 0,2 (5,3)	3,9 ± 0,7 (17,2)
Integridade funcional da membrana plasmática	75,5 ± 10,5 (13,9)	75,5 ± 17,1 (22,6)
DMAI	12,3 ± 7,5 (61,4)	14,4 ± 6,7 (46,6)
DMEN	18,3 ± 8,3 (45,4)	20,0 ± 14,9 (74,7)
DT	30,5 ± 10,3 (33,9)	34,4 ± 16,8 (48,8)

Médias ± desvio padrão (coeficiente de variação). Sem diferenças pelo teste de Tukey ($P>0,05$) ou Kruskal-Wallis* ($P>0,05$). CONC: concentração espermática por mL ($\times 10^6$); MOT: motilidade total (%); VIG: vigor espermático (1 – 5); Integridade funcional da membrana plasmática: avaliada pelo teste hiposmótico (HOST) (% de células reativas ao teste); DMAI (% de defeitos maiores); DMEN (% de defeitos menores); DT (% de defeitos totais). MM: meio de manutenção comercial; SF: soro fisiológico.

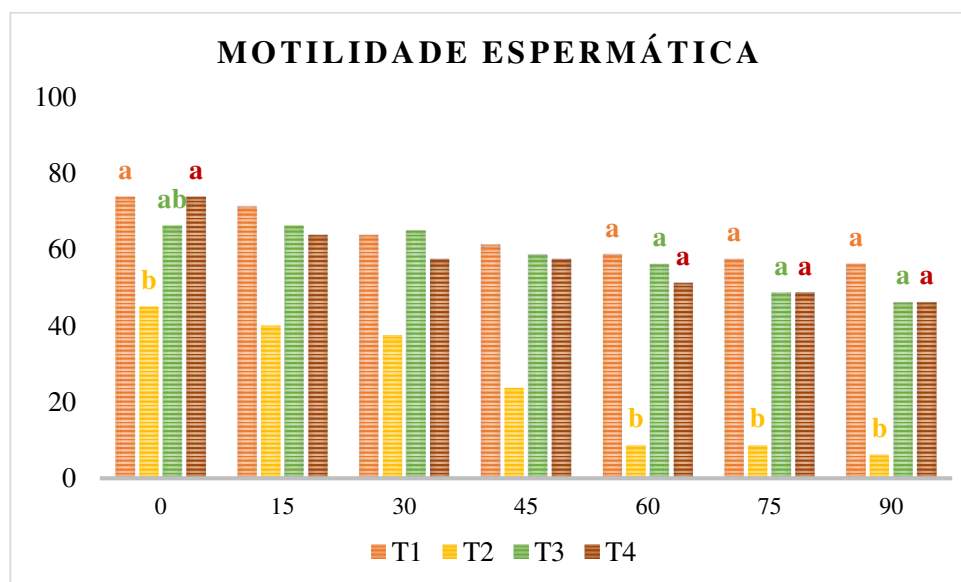


Figura 1. Médias de motilidade espermática durante o teste de termorresistência em amostras epididimárias de cão submetidas a diferentes tratamentos, reaquecidas após 24 horas de resfriamento *ex situ*. T1: AEE obtidas com meio de manutenção comercial (MM) e diluídas em MM; T2: amostras coletadas com soro fisiológico (SF) e diluídas em SF; T3: amostras coletadas com SF e diluídas em MM acrescido de 10 % de SF; T4: amostras coletadas com SF e diluídas em MM acrescido de 10 % de fluido prostático.

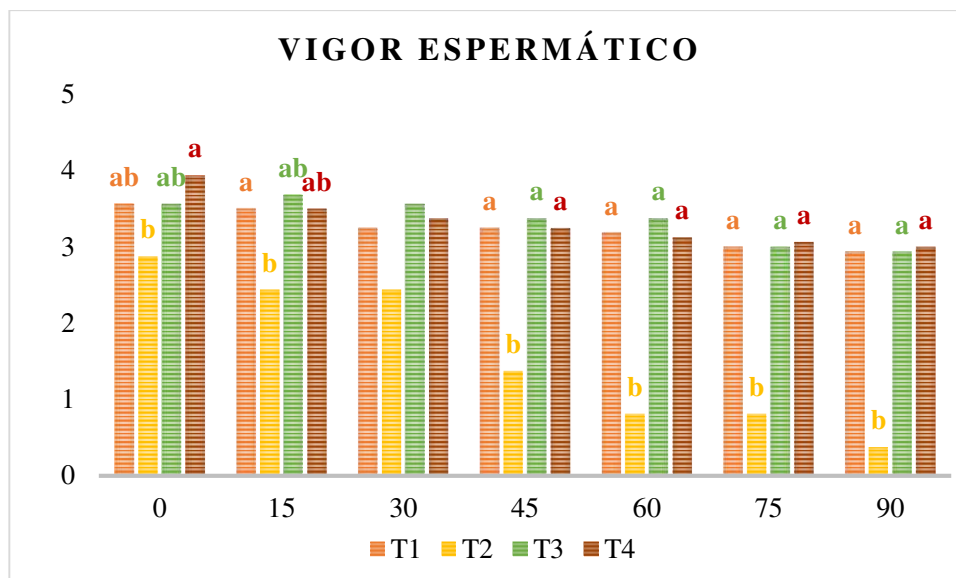


Figura 2. Médias de vigor espermático durante o teste de termorresistência em amostras epididimárias de cão submetidas a diferentes tratamentos, reaquecidas após 24 horas de resfriamento *ex situ*. T1: AEE obtidas com meio de manutenção comercial (MM) e diluídas em MM; T2: amostras coletadas com soro fisiológico (SF) e diluídas em SF; T3: amostras coletadas com SF e diluídas em MM acrescido de 10 % de SF; T4: amostras coletadas com SF e diluídas em MM acrescido de 10 % de fluido prostático.

A presença do meio de manutenção durante o processo de resfriamento não influenciou a integridade funcional da membrana plasmática e o percentual de patologias espermáticas ($P>0,05$) (Tabela 2). A adição de 10 % de fluido prostático ao meio de manutenção durante o resfriamento não influenciou os parâmetros quantitativos e qualitativos avaliados após 24 horas de armazenamento ($P>0,05$).

Tabela 2. Integridade espermática em amostras epididimárias caninas submetidas a diferentes tratamentos avaliadas após 24 horas de resfriamento *ex situ*.

Parâmetro	Tratamentos			
	1	2	3	4
Integridade funcional da membrana plasmática	70,1 ± 8,3	64,4 ± 7,6	72,5 ± 14,4	71,4 ± 1,4
DMAI	9,9 ± 6,2	12,5 ± 7,4	9,9 ± 10,8	9,8 ± 13,8
DMEN	20,0 ± 6,2	26,4 ± 8,7	16,1 ± 7,1	17,1 ± 6,7
DT	29,9 ± 5,2	38,9 ± 13,1	26,0 ± 15,8	26,9 ± 8,1

Médias ± desvio padrão. Integridade funcional da membrana plasmática: avaliada pelo teste hiposmótico (HOST) (% de células reativas ao teste); DMAI (% de defeitos maiores); DMEN (% de defeitos menores); DT (% de defeitos totais). T1: AEE obtidas com meio de manutenção comercial (MM) e diluídas em MM; T2: amostras coletadas com soro fisiológico (SF) e diluídas em SF; T3: amostras coletadas com SF e diluídas em MM acrescido de 10 % de SF; T4: amostras coletadas com SF e diluídas em MM acrescido de 10 % de fluido prostático.

4. DISCUSSÃO

A coleta de espermatozoides epididimários *post-mortem* ou após orquiectomia tem sido uma importante ferramenta para formar bancos de germoplasmas de espécies em via de extinção e para conservação do material genético de espécies de alto valor sendo possível sua utilização imediata ou futura em tecnologias de reprodução assistida (Assumpção et al., 2016; Benítez et al., 2018). Dentre as técnicas utilizadas, a fragmentação da cauda do epidídimo e flutuação espermática em meio é a mais disseminada, porém as amostras coletadas apresentam-se frequentemente contaminadas com restos celulares, eritrócitos, leucócitos e, às vezes, bactérias ou vírus, representando fontes de espécies reativas de oxigênio, prejudiciais aos espermatozoides (Valeanu & Drugociu, 2014; Hori et al., 2015). Nesse sentido, objetivando coletas de amostras mais límpidas, no presente trabalho os espermatozoides foram obtidos através de perfusão por fluxo retrógrado (FR), técnica que consiste na aplicação de meio intraluminar sob pressão no ducto deferente, promovendo fluxo em direção à cauda do epidídimo isolada (Martinez-Pastor et al., 2006). O FR comparado com outras metodologias, permite a obtenção de amostras mais limpas, apresentando ainda, melhor rendimento quantitativo (Bergo, 2018); no entanto, sua aplicação demanda um treinamento prévio, principalmente quando são canulados ductos deferentes de pequeno calibre (Hori et al., 2015; Bergo, 2018).

Mediante uso da técnica de FR para coletas de AEEs, Paula et al. (2018) obtiveram maior número de espermatozoides totais e melhores parâmetros qualitativos do que com o uso da técnica de fragmentação ($522,5 \times 10^6 \pm 31 \times 10^6$ vs. $292,9 \times 10^6 \pm 17 \times 10^6$), porém estes resultados foram ainda inferiores aos observados no presente estudo com o uso da técnica de FR, contudo, Hori et al. (2015), embora não tenham observado diferenças significativas, também utilizando a técnica de FR e a técnica de fragmentação, nos parâmetros qualitativos e quantitativos analisados, observaram maior performance da técnica de fluxo retrógrado; sendo o número de espermatozoides totais menor aos observados no presente estudo ($595,8 \times 10^6 \pm 90,2$) e os valores qualitativos cinéticos maiores em números absolutos. No presente trabalho os valores qualitativos cinéticos das amostras coletadas por FR foram semelhantes daqueles descritos por Varesi et al. (2014) usando a fragmentação, porém, maiores daqueles

descritos por Melo et al. (2010) também com o uso da técnica de fragmentação da cauda do epidídimo.

A perfusão adicional de ar ao final do fluxo retrógrado com meio permite a recuperação de maior volume espermático (Silva et al., 2018). No presente trabalho, o FR foi realizado usando MM ou SF com acréscimo de 1 mL de ar na seringa com o objetivo de melhor acompanhamento da totalidade da perfusão; assim, independente da solução de perfusão utilizada na técnica de FR (MM ou SF), não foram observadas diferenças quantitativas e/ou qualitativas nas amostras analisadas (Tabela 1), porém, em números absolutos a coleta com SF apresentou valores maiores no número total de espermatozoides coletados, enquanto as coletas obtidas por perfusão com MM apresentaram valores qualitativos cinéticos maiores que o SF. Ponglowhapan et al. (2006) com uso de FR obtiveram valores médios para MOT de $77,2 \pm 6,8$ % também com uso de meio Tris-citrato, valores inferiores aos observados no presente trabalho. Paula et al. (2018) ao usar o meio comercial Caniplus Enhance[®] para coleta epididimária por FR obtiveram valores médios para motilidade progressiva de $78,75 \pm 0,1$ %, inferiores aos observados no presente trabalho com o uso de meio com Tris-citrato. Ainda com a mesma técnica de coleta epididimária Nöthling et al. (2007) usando os meios BilEq (Biladyl - Equex STM paste) e AndroMed obtiveram para motilidade progressiva $42,7 \pm 1,6$ % e $30,0 \pm 1,6$ % respectivamente, valores também inferiores aos observados no presente trabalho.

Os valores para a integridade funcional de membrana plasmática obtidos no presente estudo, quando usado MM ou SF para a recuperação das AEEs, não mostraram diferenças ($P > 0,05$) (Tabela 2), sendo estes valores próximos aos encontrados em AEEs obtidas por meio de outras técnicas, como fragmentação da cauda do epidídimo e compressão da cauda do epidídimo e do ducto deferente com lâmina de vidro ($74,4 \pm 11,6$ %; Hishinuma et al., 2003 e $79,7 \pm 4,0$ %; Pennacchisavi et al., 2015, respectivamente).

As porcentagens de defeitos totais observadas nas AEEs no presente estudo não apresentaram diferenças quando obtidas com o uso de MM ou SF ($P > 0,05$), e apresentam-se próximos aos valores normatizados como aceitáveis para a espécie (CBRA, 2013). Os valores de DT do presente trabalho (Tabela 2) foram menores dos observados após técnica de fragmentação da cauda do epidídimo por Varesi et al. (2014) (52 %) com meio Ham's F-10 e aos obtidos por Hishinuma et al. (2003) (47

%) em meio com BSA. Paula et al. (2018) observaram melhores resultados ao avaliar a morfologia espermática de AEEs obtidas com a técnica de FR com uso do meio Caniplus Enhance[®] quando comparado ao meio comercial Nutricell[®]. Hori et al. (2015) quando usado apenas fluido prostático para a obtenção de AEEs por FR observaram baixa quantidade de DT (7,1 %).

No que diz respeito à longevidade da qualidade cinética das amostras após o resfriamento, verificou-se uma influência favorável do meio de manutenção na MOT ($P < 0,05$) (principalmente uma hora após início do TTR) e no VIG ($P < 0,05$) (evidente após 45 minutos de avaliação do TTR), independente da solução utilizada para a coleta, demonstrando a importância da adição de MM em AEEs que serão refrigeradas, por proporcionar componentes que protegem e estabilizam a membrana plasmática dos espermatozoides (Bueno et al., 2001) (Figuras 1 e 2).

Ponglowhapan et al. (2006) sugerem a conservação por resfriamento de AEEs em meio Tris-Gema com frutose, semelhante ao usado no presente trabalho, como uma boa alternativa para preservar a viabilidade de espermatozoides que não podem ser congelados imediatamente após coleta. Armas et al. (2011) observaram que após o armazenamento de conjuntos testículo-epidídimos caninos por 24 horas sob refrigeração, foi possível a obtenção de AEEs, por meio da técnica de fragmentação, com MOT de $69,0 \pm 8,43$ %, valores próximos aos observados no presente estudo (Tabela 1 e Figura 1) com o armazenamento de AEEs associado ao meio Tris-Citrato-Gema ($73,8 \pm 15,1$ %), pelo mesmo período de tempo, porém superiores às aquelas amostras armazenadas em soro fisiológico ($45,0 \pm 28,3$ %). Neste sentido, quando não é possível a coleta e resfriamento de AEEs com meio apropriado, a manutenção dos epidídimos sob refrigeração pode ser uma alternativa mais adequada para a obtenção de amostras viáveis.

Em cães, a próstata é a principal glândula acessória aos órgãos reprodutores masculinos, assim o plasma seminal nessa espécie é constituído basicamente pelo fluido prostático (FP), o qual é secretado especialmente, e em grande quantidade proporcional, no final do processo ejaculatório; portanto, espermatozoides coletados diretamente da cauda do epidídimo não entram em contato com o FP (Nöthling et al. 2007; Hori et al., 2015). Neste sentido, Hori et al. (2015) utilizaram como solução de perfusão para a técnica de FR um pool de fluido prostático previamente coletado e armazenado, e observaram que a MOT imediatamente após a coleta foi superior em

números absolutos ($92,2 \pm 0,9 \%$) aos valores observados no presente estudo com o uso de MM ou SF.

O presente estudo testou o efeito da adição de FP na qualidade de espermatozoides obtidos do epidídimo após resfriamento. Em pesquisas anteriores tem sido recomendada a adição de FP prévio ao congelamento ou após descongelamento, visando melhor MOT, longevidade, morfologia espermática (Nöthling et al. 2007) e preservação do DNA (Koderle et al. 2009). Korochkina et al. (2014) observaram um aumento nos valores cinéticos em AEEs quando adicionado FP antes do congelamento. No presente estudo, a adição de 10 % de FP no meio de manutenção durante o resfriamento não mostrou diferenças quanto à MOT e ao VIG em relação aos armazenados em MM com adição de 10 % de SF. Do mesmo modo, Melo et al. (2010) ao adicionar 10 % de FP em AEEs, não evidenciaram diferenças ($P>0,05$) na MOT, PMOT e VIG avaliados após congelamento.

Na avaliação da integridade funcional da membrana plasmática após resfriamento não se observaram diferenças entre os tratamentos testados ($P>0,05$), porém, observou-se pelos valores absolutos obtidos, que os tratamentos contendo MM (T1, T3, T4) preservaram melhor a integridade da membrana plasmática. Os DT observados após a avaliação morfológica mantiveram valores aceitáveis após resfriamento (CBRA, 2013), nos tratamentos em que foi adicionado MM, porém, foram visualizadas altas porcentagens de DT em AEEs obtidas e resfriadas somente com SF (T2). As principais alterações morfológicas identificadas em AEEs de cães incluem dobramentos/enrolamentos de cauda e gota citoplasmática (Hishinuma et al., 2003; Hori et al., 2015; Pennacchisavi et al., 2015). Hori et al. (2015) observaram que após o congelamento de AEEs de cães houve diminuição da incidência de gota citoplasmática (de 61 para 4 %), provavelmente removidas por ação mecânica durante o congelamento; além disso Nöthling et al. (2007) e Hori et al. (2015) verificaram que a sensibilização prévia ao congelamento de espermatozoides caninos com FP promove a perda da gota citoplasmática; porém, Korochkina et al. (2014) não observaram diferenças na morfologia espermática de AEEs diluídas em meio Tris ou com FP também prévio ao congelamento. No presente estudo, a adição de MM com acréscimo de 10 % de FP (T4) em AEEs não apresentou diferenças nas patologias espermáticas quando comparado com os demais tratamentos (Tabela 2).

Melo et al. (2010) ao realizar o TTR de AEEs de cães, recuperadas em meio Tris-Citrato, de epidídimos armazenados durante 24 horas, observou a preservação de MOT mínima de 10 % por um período médio de até $165 \pm 21,2$ minutos. No presente estudo, as amostras após resfriamento durante 24 horas foram avaliadas por até 90 minutos, durante esse tempo foi observada maior longevidade naqueles tratamentos preparados com MM (T1, T3 e T4) quando comparados com o T2, onde a coleta epididimária e a preservação durante o resfriamento foi realizada com SF.

5. CONCLUSÃO

A técnica de fluxo retrógrado para recuperação de espermatozoides caninos pode ser realizada mediante perfusão de soro fisiológico ou meio Tris-Citrato-Gema com adição de ar, sem alterar a qualidade imediata da amostra.

Para obtenção de características espermáticas desejáveis e duradouras, as amostras armazenadas em MM oferecem melhores resultados após 24 horas de resfriamento entre 4 – 6 °C. Estas amostras apresentam valores normatizados como aceitáveis (CBRA, 2013) para vigor e motilidade espermática, por até uma hora e meia sob teste de termorresistência.

O meio de manutenção com acréscimo de 10 % de fluido prostático, quando adicionado em amostras espermáticas epididimárias caninas submetidas à refrigeração por 24 horas entre 4 – 6 °C, não melhora significativamente os parâmetros qualitativos cinéticos, de integridade de membrana plasmática e do percentual de células normais.

6. REFERÊNCIAS

ARMAS, R. S.; FERNÁNDEZ, A. V.; VÁSQUEZ, C. M.; SANTIANI, A. A.; Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía. **Rev Inv Vet Perú**, v. 22, n. 3, p. 199-205. 2011. DOI: 10.15381/rivep.v22i3.257

ASSUMPÇÃO, T. I.; SANTOS, A. L. Q.; MACEDO, G. G.; PEIXOTO, L. R.; ZAMPINI, A. C. A. Coleta e avaliação morfológica dos espermatozoides epididimários de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer. **Anais... VIII Encontro sobre Animais Selvagens. III Simpósio sobre Medicina e Conservação da Fauna do Cerrado – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG**, p. 49-54. 2016.

BATISTA, M.; VILAR, J.; ROSARIO, I.; TERRADAS, E. Influence of different anaesthetic protocols over the sperm quality on the fresh, chilled (4°C) and frozen-thawed epididymal sperm samples in domestic dogs. **Reprod Dom Anim.**, p.1–8. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12743>

BENÍTEZ, G. E.; CHAMBA, O. H.; SÁNCHEZ, S. E.; LUZÓN, C. F.; SÁNCHEZ, C. J. Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. **Abanico Veterinario**, v. 8, n. 1, p. 59-74. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2018.81.6>

BERGO, L. C. F. (em preparação). **Comparação de técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários em cães**. 2018. p. 36. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Área Morfofisiologia dos animais domésticos e selvagens - Universidade Federal de Viçosa, 2018.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinärer Medicin**, v. 25, n. 7, p. 383-391. 1973.

BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; VALENTIM, F.M. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. I – Efeito do meio diluidor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.53, n.3. 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352001000300016>

CARAZO L. R. B.; DECO, T. S.; ARAÚJO, G. R.; BERGO, L. C. F.; PAULA, T. A. R. MALACARNE, J. M.; TEIXEIRA, F. R. C.; ZERLOLTINI, M. F. Evaluation of canine semen by the hypo-osmotic swelling test. In: International Symposium on Animal Biology of Reproduction. 5., 2014, Campinas, **Anais...** Campinas – SP: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2015. p. 184

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA, 104p. 2013.

CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; MORRELL, J. M. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 1284–1292. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.009>

ELLERBROCK, R. E.; PRELL, M.; STEWART, J. L.; BOJKO, M. S.; LIMA, F. S.; CANISSO, I. F. Comparison of centrifugation and non-centrifugation methods to cryopreserve stallion epididymal sêmen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 50, p. 27-32. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.11.005>

GILMORE, D. P.; HOOKER, R. H.; CHANG, M. C. A technique for the collection by fistula of epididymal spermatozoa from the rat. **J Reprod Fertil.**, v. 25, n. 1, p. 137-40. 1971.

HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Royal Microscopic Society**, v. 76, p. 84-97. 1957. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1956.tb00443.x>

HEWITSON, L.; MARTINOVICH, C.; SIMERLY, C.; TAKAHASHI, D.; SCHATTEN, G. Rhesus offspring produced by intracytoplasmic injection of testicular sperm and elongated spermatids. **Fertility and sterility**, v. 77, n. 4, p. 794 – 801. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)03281-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)03281-2)

HISHINUMA, M. & SEKINE, J. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, n. 7, p. 817-820. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.65.817>

HORI, T.; ATAGO, T.; KOBAYASHI, M.; KAWAKAMI, E. Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality. **J. Vet. Med Sci.**, v. 77, n. 5, p. 625–630. 2015. DOI: 10.1292/jvms.14-0421.

JEGOU, B.; PINEAU, C.; SAEZ, J. **Testis, Epididymis and Technologies in the Year 2000**. 11th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis. Ed. Originally published by Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. 2000. ISSN 0947-6075. ISBN 978-3-662-04052-2. 269p.

KNOBIL & NEILL'S. **Physiology of reproduction**. 3^aed. v. 1, USA: Elsevier Inc. 2006. 3238p.

KODERLE, M.; AURICH, C.; SCHÄFER, S. S. The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 72, p. 1215–20. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.015>

KOROCHKINA, E.; JOHANNISSON, A.; LAVANYA GOODLA; MORRELL, J. M.; AXNER, E. Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozen-thawed canine epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 82, p. 1206–1211. 2014. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.06.024

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, p.471–485. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.045>

MELO, M. I. V. & HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 71-78. 1999.

MELO, M. I. V.; OLIVEIRA, J. V. S.; VALLE, G. R.; RACHID, M. A.; SOARES, F. C. G.; MATOS, J. J. R. T. Efeito da centrifugação e do líquido prostático homólogo na criopreservação de espermatozoides epididimários caninos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 3, p. 603-608. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000300015>

NOAKES, D.E. et al. **Arthur's veterinary reproduction and obstetrics**. 8.ed. China Saunders: Elsevier. 2006. 868p.

NÖTHLING, J. O.; SHUTTLEWORTH, R.; DE HAAS, K.; THOMPSON, P. N. Homologous prostatic fluid added to frozen–thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. **Theriogenology**. v. 64, p. 975–991. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.002>

NÖTHLING, J. O.; GERBER, D.; COLENBRANDER, B.; DIJKSTRA, M.; BAKKER, T.; DE CRAMER, K. The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed. **Theriogenology**, v. 67, p. 264–275. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000300015>

PAULA, T. A. R.; SILVA, T.; BERGO, L.; CARAZO, L. R. B.; MATEUS, L. Effect of different media used during the collection of spermatozoa from the tail of the epididymis in the dog. **Proceedings** of the 21th European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR) Congress Venice Italy - June 22nd-23rd. 2018.

PENNACCHISAVI, P. P. A.; MOTHEO, T. F.; NAKAGHI, L. C. P.; BUTTLER, E. P.; VICENTE, W. R. R. Técnica modificada de compressão do ducto deferente e cauda do epidídimo para obtenção de espermatozoides caninos. **Revista Investigação Medicina Veterinária**, v. 14, n .1, p. 1-7. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.26843/investigacao.v14i1.835>

PRAPAIWAN, N.; THARASANIT, T.; PUNJACHAIPORNPOL, S.; YAMTANG, D.; ROONGSITTHICHAI, A.; MOONARMART, W.; KAEOKET, K.; MANEE-IN S. Low-density lipoprotein improves motility and plasma membrane integrity of cryopreserved canine epididymal spermatozoa. **Asian Australas. J. Anim. Sci.**, v. 29, n. 5 p. 646-651, 2016. DOI: 10.5713/ajas.15.0572

PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K.; SIRIVAIDYAPONG, S.; LOHACHIT, C. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. **Theriogenology**. v. 66, p. 1633–1636. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.032>

SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT[®] 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SILVA, T.; DINIZ, P.; BERGO, L.; CARAZO, L. R. B.; PAULA, T. A. R.; MATEUS, L. Comparison of three techniques of sperm collection from the tail of epididymis in the dog. **Proceedings...** 21th European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR) Congress Venice Italy - June 22nd-23rd. 2018.

Sociedade Brasileira de Urologia – SBU. **Recomendações SBU – Reprodução Human**. 2012. 29p.

VALEANU, S. N.; DRUGOCIU, D. Biomimetic technologies - usefull tool in conservation of endangered species. **International Journal of Conservation Science**, v. 5, n. 3, p. 409-418. 2014.

VARESI, S.; VERNOCCHI, V.; MORSELLI, M. G.; LUVONI, G. C. DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa. **Reproductive biology**, v. 14, p. 257 – 261. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2014.07.001>

**USO DA CENTRIFUGAÇÃO EM CAMADA ÚNICA ATRAVÉS DE
COLOIDE NA SELEÇÃO DE AMOSTRAS ESPERMÁTICAS
EPIDIDIMÁRIAS DE CÃO DOMÉSTICO COM E SEM A ADIÇÃO DE
FLUÍDO PROSTÁTICO. USO POTENCIAL EM ANIMAIS SELVAGENS**

RESUMO

Objetivou-se avaliar a qualidade de amostras espermáticas epididimárias, coletadas por fluxo retrógrado (FR), submetidas ao processo de seleção em camada única através de coloide (SLC) e o acréscimo de fluido prostático (FP) previamente ao resfriamento entre 4 – 6 °C por até 72 horas. Oito pares de conjuntos testículo-epidídimo foram refrigerados durante 24 horas. Em cada animal as amostras espermáticas epididimárias (AEEs) foram obtidas pela técnica de FR usando para a perfusão meio de manutenção (MM) e ar. As AEEs coletadas de cada animal, de ambos os conjuntos cauda do epidídimo-ducto deferente direito e esquerdo foram associadas em uma única amostra, sendo calculada a concentração espermática / mL. A qualidade das AEEs coletadas em cada animal foi determinada imediatamente após a recuperação epididimária pela avaliação da motilidade espermática (MOT), do vigor espermático (VIG), da morfologia espermática e da integridade funcional da membrana plasmática. As AEEs obtidas de cada animal foram subdivididas e submetidas a centrifugação em dois grupos experimentais: G1 – AEEs submetidas à SLC com Androcoll-C™ (AC) e G2 – AEEs centrifugada com soro fisiológico (SF); foi calculado o número total de espermatozoides obtidos após centrifugações para cálculo da taxa de recuperação espermática. Os grupos foram avaliados novamente quanto à MOT, o VIG, a integridade funcional da membrana plasmática e a morfologia espermática. As amostras obtidas em cada grupo foram ressuspensas com ou sem FP, para preparação dos tratamentos: T1: AEE centrifugada com AC ressuspensa em MM acrescido de 10 % de FP; T2: AEE centrifugada com AC ressuspensa em MM acrescido de 10 % de SF; T3: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de FP e T4: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de SF. Após a centrifugação foram realizadas novas avaliações de

MOT, VIG, integridade funcional da membrana plasmática e morfologia espermática. Os tratamentos foram refrigerados por até 72 horas. Após as primeiras 24 horas de resfriamento foi avaliada a MOT, o VIG, a integridade funcional da membrana plasmática, a morfologia espermática e realizado o teste de termorresistência (TTR). Após 48 horas adicionais de resfriamento, novas avaliações espermáticas foram realizadas. As taxas de recuperação espermática foram de 18 e 38 % (para SLC e centrifugação convencional, respectivamente). Não houve diferenças ($P>0,05$) entre os parâmetros espermáticos antes e após centrifugações. Após 24 horas de resfriamento foi observada maior MOT no T4 em relação T2, e maior VIG no T3 em relação ao T2 ($P<0,05$). Após TTR o T3 e T4 apresentaram performance superior ($P<0,05$) daqueles submetidos à SLC. Após 72 horas de resfriamento o VIG no T3 foi superior comparado ao T1 e T2 ($P<0,05$). Os defeitos maiores, menores e totais foram menores em ao menos um dos tratamentos submetidos a SLC ($P<0,05$). A coleta de espermatozoides epididimários usando perfusão de meio por FR com adição de ar permitiu a obtenção de AEEs com características espermáticas aceitáveis; a taxa de recuperação foi maior nas AEEs centrifugadas com SF do que a obtida após SLC; a SLC preveniu o aumento de patologias espermáticas após 72 horas de resfriamento; o acréscimo de 10 % de FP no MM não teve efeito sobre as AEEs nas condições amostradas; AEEs resfriadas por 24 horas *in situ* e por até 72 horas *ex situ* apresentaram parâmetros espermáticos compatíveis para utilização em programas de reprodução, com uso potencial em carnívoros silvestres.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Lista Vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2018) mais de 26.000 espécies encontram-se ameaçadas de extinção, processo que embora possa ser natural, atualmente ocorre de forma mais acelerada. Nesse sentido, a formação de germoplasmas a partir da preservação de espermatozoides epididimários recuperados *post-mortem* ou após orquiectomia, tem se tornado uma alternativa para o uso em programas de conservação de espécies ameaçadas, no caso de animais domésticos permite o uso imediato ou posterior do material genético de indivíduos de alto valor comercial (Assumpção et al., 2016;

Jewgenow et al., 2017). Um fato comum, no Brasil, é a constante presença de cadáveres de animais silvestres nas estradas. Em recente estimativa do Centro Brasileiro de Estudos em Ecologia de Estradas 475 milhões de atropelamentos a animais silvestres são relatados anualmente e, muitos deles, são encontrados já mortos (Bager, 2017). Diante dessa trágica estatística, há uma possível ação conservacionista a ser feita, a coleta e preservação de gametas desses animais mortos; assim, no caso dos machos podem-se coletar os espermatozoides armazenados no epidídimo e ducto deferente (Morris et al., 2002).

O desenvolvimento de biotecnologias utilizando animais domésticos filogeneticamente próximos, como modelo experimental, tem ganhado grande destaque. Neste cenário o cão doméstico vem desempenhando importante papel, permitindo a pesquisa, o aprimoramento e a aplicabilidade dessas tecnologias às espécies silvestres ameaçadas (Luvoni et al 2003; Buranaamnuay, 2018).

Várias são as técnicas de coleta epididimária descritas para as espécies domésticas e selvagens, dentre elas podem ser citadas: a fragmentação e flutuação da cauda do epidídimo (felino: Chatdarong et al., 2016; canino: Bergo, 2018); compressão da cauda do epidídimo com pinça hemostática ou lâmina de vidro (canino: Pennacchisavi *et al.*, 2015); fistula cirúrgica (rato: Gilmore et al., 1971) e a perfusão por fluxo retrógrado (FR) do ducto deferente e cauda do epidídimo (veado: Martinez-Pastor et al., 2006; canino: Batista et al., 2016; bovino: Benítez et al., 2018; equinos: Ellerbrock et al., 2017). Assim, a escolha da técnica a ser utilizada nesse tipo de procedimento deve ser baseada considerando-se os recursos logísticos, tempo disponível e a familiaridade do manipulador com a mesma (Bergo, 2018). Algumas técnicas de recuperação de amostras espermáticas epididimárias (AEEs) apresentam contaminação com restos celulares, eritrócitos, leucócitos e, às vezes, bactérias ou vírus, estes contaminantes representam fontes de espécies reativas de oxigênio, prejudiciais aos espermatozoides (Valeanu & Drugociu, 2014; Hori et al., 2015). Nesse sentido a técnica de perfusão por fluxo retrógrado, permitiria a recuperação de AEEs mais límpidas e com melhor rendimento quantitativo (Muñoz-Fuentes et al., 2014; Bergo, 2018).

A centrifugação em camada única (SLC) é uma técnica que através de um coloide espécie-específico (AndrocollTM), constituído por sílica revestida de glicidoxipropiltrimetoxissilano, é utilizada na seleção de espermatozoides de maior

qualidade em termos de cinemática espermática, morfologia, integridade de membranas e de cromatina, durabilidade dos espermatozoides durante o armazenamento, diminuição de patógenos no ejaculado, efeito positivo na separação celular para sexagem de sêmen, além do uso potencial em outros tipos celulares (Morrell, 2011; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2016; Dorado et al., 2013; Urbano et al., 2013; Morrell et al., 2019). A SLC tem sido utilizada com sucesso na purificação de amostras de espermatozoides epididimárias provenientes de lobos cinzentos (Muñoz-Fuentes et al., 2014) e de veados vermelhos (Anel-López et al., 2015) *post-mortem*, porém sua aplicação em AEEs caninas tem sido pouco estudada.

A criobiologia é a principal ferramenta para a conservação de gametas nas diferentes espécies, e é potencialmente o mais poderoso conjunto de protocolos a favor da preservação *in vitro* de espécies raras e ameaçadas (Durrant, 1990). Sabe-se, porém, que um dos principais problemas durante o congelamento de espermatozoides são os danos produzidos nas membranas destes, devido a isto, o uso de técnicas alternativas como o resfriamento permite a manutenção temporária da viabilidade de amostras espermáticas (Olivo-Zepeda et al., 2011). Ponglowhapan et al. (2006) sugerem a conservação por resfriamento de AEEs em meio Tris-gema com frutose, como uma boa alternativa para preservar a viabilidade de espermatozoides, que não podem ser congelados imediatamente após coleta. Já Armas et al. (2011), relatam também a possibilidade de armazenamento *in situ* de espermatozoides através do resfriamento dos epidídimos caninos por até 72 horas, com a posterior obtenção de AEEs com viabilidade para o uso em programas de reprodução assistida.

O plasma seminal apresenta como funções: o fornecimento de energia para os espermatozoides, a manutenção da pressão osmótica, a quelação de íons livres de cálcio, o efeito tampão, a imunossupressão no trato genital feminino e a regulação da motilidade dos espermatozoides (Noakes, 2006). Em carnívoros a próstata é a principal glândula acessória aos órgãos reprodutores masculinos, assim o plasma seminal nessas espécies é constituído basicamente pelo fluido prostático (FP), o qual é secretado especialmente, e em grande quantidade proporcional, no final do processo ejaculatório; por tanto, espermatozoides coletados diretamente da cauda do epidídimo deixam de ser sensibilizados pelo FP (Hori et al., 2015). O efeito da adição de FP tem sido testada em diferentes protocolos de conservação de espermatozoides de cães, mesmo a partir de coleta ejaculatória, demonstrando melhora da cinemática

espermática (Korochkina et al., 2014), bem como a diminuição de patologias espermáticas (Nöthling et al., 2007) e aumento das taxas de concepção após inseminação artificial (IA) (Nöthling et al., 2005; Hori et al., 2015). Neste sentido o presente trabalho tem como objetivo avaliar a submissão de amostras espermáticas epididimárias, coletadas a partir da técnica de fluxo retrógrado, ao processo de seleção em camada única de coloide e à sensibilização com fluido prostático previamente ao resfriamento por até 72 horas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e Comissão de Ética

As coletas e análises das amostras espermáticas epididimárias (AEEs) foram feitas conjuntamente no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Animais Selvagens (REPAAS) e no Laboratório de Andrologia Animal (LAA) da UFV. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 11/2015).

2.2 Animais

Testículos e epidídimos foram obtidos como material de descarte de castrações eletivas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa e do programa de castração da Sociedade Viçosense de Proteção aos Animais (SOVIPA). Segundo as informações coletadas através das fichas clínicas, os animais apresentaram idade entre 1 e 3 anos, pesando entre 6 e 22 Kg e sem raça definida (SRD).

Oito pares de conjuntos testículo-epidídimo-ducto deferente, ligados individualmente com sutura para evitar extravasamento das AEEs, foram transportados imediatamente após a cirurgia para o REPAAS, em solução salina (NaCl 0,9 %) à temperatura ambiente (± 25 °C). Posteriormente, foram lavados com solução salina e alocados em recipientes individuais tampados e mantidos em refrigerador convencional entre 4 – 6 °C por 24 horas (resfriamento *in situ* das AEEs).

2.3 Obtenção das amostras espermáticas epididimárias

A cauda epididimária e uma porção do ducto deferente, correspondente ao tamanho total do epidídimo, foi isolada do restante do conjunto. As caudas dos epidídimos foram novamente lavadas com solução salina aquecida (37 °C), dissecadas (removendo os vasos sanguíneos aderentes à superfície) para diminuir a contaminação com sangue. Em seguida, foram acondicionadas em placas de Petri para realizar a recuperação espermática pela técnica de perfusão com fluxo retrógrado (FR) usando um meio de manutenção (MM) (TRIS-CITRATO: 24g/L de TRIS, 14 g/L de ácido cítrico, 8 g/L de glicose, 2 g/L de amicacina, 200 g/L de gema de ovo; Nutricell[®], SP-Brasil).

Para realização da técnica de FR, o ducto deferente foi canulado por meio de uma agulha hipodérmica descartável estéril de pequeno calibre (BD[®] 0,45x13 mm, 26G), acoplada a uma seringa descartável estéril de 3 mL de capacidade, contendo 1 mL do MM e 1 mL de ar (Silva et al., 2018). Foi então promovido fluxo lento, no sentido da cauda do epidídimo. Todo o conteúdo coletado foi: aspirado e mensurado, utilizando pipeta automática; depositado em tubo plástico com capacidade de 1,5 mL e mantido em banho-maria a 37 °C para a realização das avaliações espermáticas iniciais dos parâmetros cinéticos. As amostras espermáticas epididimárias (AEEs) coletadas de cada animal, em ambos os conjuntos cauda do epidídimo-ducto deferente direito e esquerdo, foram então associadas em uma única amostra. Nas AEEs foi aferida a concentração espermática por mL em câmara de Neubauer seguindo a técnica corriqueira (CBRA, 2013).

A qualidade das AEEs coletadas em cada animal foi determinada imediatamente após a recuperação epididimária pelo mesmo avaliador, mediante avaliação da motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), morfologia espermática e integridade funcional da membrana plasmática.

2.4 Avaliação das amostras espermáticas epididimárias

Para avaliação da MOT (%) e do VIG (1 – 5) foi depositada uma alíquota de 10 µL da amostra em lâmina de vidro preaquecida a 37 °C, coberta por lamínula e imediatamente avaliada em microscópio óptico de luz em aumento de 400 x. A avaliação foi feita em, no mínimo, cinco campos aleatórios da lâmina.

A morfologia espermática foi avaliada a partir de um preparado contendo 30 µL da amostra espermática em 1 mL de formol-salina tamponada (Hancock, 1957). As análises foram feitas por meio de preparação úmida em microscópio de contraste de fase (Olympus® - BX41) em aumento de 1000 x (sob gota de óleo de imersão). Foram contadas 200 células de cada amostra espermática e classificadas em defeitos maiores, menores e totais segundo Blom (1973).

Para a determinação da integridade de membrana plasmática a partir do teste hiposmótico (HOST) foram homogeneizados em tubos plásticos com capacidade de 1,5 mL uma alíquota de 20 µL da AEE em 1 mL água destilada (*water test*) e incubados em seguida por 30 minutos em banho-maria a 37 °C (Carazo et al., 2014). Após o período de incubação, foram adicionados 0,5 mL de uma solução de formol-salina tamponada (Hancock, 1957) para fixação e avaliação. Foram avaliadas 100 células em microscópio de contraste de fase em aumento de 1000 x (sob gota de óleo de imersão). Foram consideradas reativas ao teste, todas aquelas células que apresentaram enrolamento ou dobra de cauda e o resultado final foi determinado pela subtração das caudas alteradas antes do teste (valores registrados na avaliação morfológica) (Melo & Henry, 1999).

2.5 Delineamento experimental

As AEEs obtidas de cada animal foram subdivididas e submetidas a centrifugação em dois grupos experimentais, sendo: G1 – AEE centrifugada com o coloide Androcoll-C™ (AC) e G2 – AEE centrifugada com soro fisiológico (SF). As amostras obtidas em cada grupo foram ressuspensas com e sem a adição de fluido prostático e mantidas resfriadas entre 4 – 6 °C por até 72 horas, assim foram delineados quatro tratamentos, sendo: T1: AEE centrifugada com AC ressuspensa em MM acrescido de 10 % de fluido prostático (FP); T2: AEE centrifugada com AC ressuspensa em MM acrescido de 10 % de SF; T3: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de FP e T4: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de SF.

2.6 Obtenção do fluido prostático

Para obtenção do fluido prostático (FP) foi feita uma coleta manual de ejaculado em 4 cães saudáveis, de raças variadas em idade entre 3 e 5 anos, com

parâmetros seminais normais (motilidade > 70 % e < 30 % de patologias espermáticas totais). Na coleta do ejaculado em cada animal foi eliminada a fração rica em espermatozoides e coletada apenas a fração de FP, que foi ainda centrifugada individualmente a 700 x g durante 10 minutos, coletando-se então o sobrenadante de cada amostra e misturando o de todos os animais para formar um pool, o qual foi devidamente homogeneizado em agitador (Vortex Mixer - Xh-C Coleman). Posteriormente, foi armazenado em tubos plásticos com capacidade de 1,5 mL a -20 °C até seu uso.

2.7. Centrifugação em camada única em coloide

Para a centrifugação em camada única através de coloide foi utilizado o produto Androcoll-C™ (Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suécia), coloide desenvolvido para a espécie canina, onde os espermatozoides são centrifugados através de uma coluna de sílica revestida de glicidoxipropiltrimetoxissilano. Nesse sentido, foi adicionado a um tubo de centrifugação com capacidade de 15 mL, 0,8 mL de AC equilibrado a temperatura ambiente (± 25 °C) e na superfície do mesmo, foi adicionado gentilmente 1 mL da AEE. Paralelamente, em outro tubo de centrifugação de 15 mL foi depositado 0,8 mL de SF e 1 mL da AEE. Ambos os tubos foram submetidos a centrifugação, em centrífuga de base móvel (Excelsa® i 2206) a 300 x g durante 20 minutos. De cada tubo foi recuperado 0,6 mL do pellet formado na base do tubo contendo os espermatozoides; para tal, uma pipeta automática foi introduzida no fundo do tubo e a amostra foi cuidadosamente aspirada. Esta foi depositada em tubo plástico com capacidade de 1,5 mL mantido em banho maria a 37 °C. Os parâmetros cinéticos e a concentração espermática foi aferida e esta padronizada para 50×10^6 de espermatozoides por mL, ressuspensos conforme os tratamentos descritos anteriormente. Após a ressuspensão as amostras foram imediatamente avaliadas quanto à MOT, VIG, morfologia espermática e integridade funcional da membrana plasmática. Para o cálculo da taxa de recuperação dos espermatozoides centrifugados em cada grupo, a população espermática em 1 mL de AEE pré centrifugação foi comparada com a população espermática total obtida em 0,6 mL do pellet pós centrifugação.

2.8 Resfriamento

Posteriormente, todos os tratamentos foram mantidos em refrigerador convencional entre 4 – 6 °C por 72 horas (resfriamento *ex situ*). Após as primeiras 24 horas uma alíquota de cada tratamento foi transferida e mantida em banho maria a 37 °C durante 10 minutos para estabilização e avaliadas quanto a MOT, VIG, morfologia espermática e integridade funcional da membrana plasmática, e a cada 15 minutos foram avaliadas a MOT e o VIG como teste de termorresistência (TTR) durante 90 minutos. Após 48 horas adicionais, alíquotas de cada tratamento foram novamente estabilizadas e reavaliadas quanto a MOT, VIG, morfologia espermática e integridade funcional da membrana plasmática.

2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo Statistical Analysis System (SAS, 2002). Os dados em percentagem foram submetidos à transformação angular ($Y' = \arcsen(\sqrt{Y})$) e analisados por ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. O vigor espermático foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

3. RESULTADOS

Imediatamente após a recuperação epididimária, as amostras espermáticas referentes à cada animal, apresentaram em média concentrações de $662,5 \times 10^6$ de espermatozoides por mL sendo possível a coleta em média de $1277,12 \times 10^6$ espermatozoides totais por animal. As amostras foram ainda avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos, presença de defeitos e integridade de membrana plasmática, sendo os dados registrados na tabela 1.

Após as centrifugações foi calculada a taxa de recuperação dos espermatozoides em cada grupo, assim, amostras de 1 mL de AEE pré centrifugação, contendo em média $662,5 \times 10^6$ espermatozoides totais, renderam em média um total de $119,1 \times 10^6$ espermatozoides após centrifugação com AC e 252×10^6 após centrifugação com SF (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação de amostras espermáticas de cães após coleta epididimária, após centrifugação em camada única em coloide e após centrifugação com soro fisiológico.

Parâmetro	AEE	Grupos de centrifugação	
		AC	SF
CONC	662,5 ± 523,7	198,6 ± 148,6	420,0 ± 265,0
Espermatozoides amostrados[□]	662,5 ± 523,7	119,1 ± 89,1	252,0 ± 159,0
Taxa de recuperação	-	18	38
MOT	79,3 ± 6,7	73,8 ± 5,0	77,5 ± 4,5
VIG*	4,1 ± 0,3	3,7 ± 0,4	4,1 ± 0,4
Integridade funcional da membrana plasmática	64,3 ± 13,3	60,7 ± 16,1	67,0 ± 13,1
DMAI	10,5 ± 7,4	6,0 ± 6,2	6,0 ± 4,2
DMEN	21,3 ± 14,2	19,3 ± 11,0	20,1 ± 12,5
DT	31,8 ± 15,2	25,3 ± 13,3	26,1 ± 14,5

Médias ± desvio padrão. Teste de Tukey ($P>0,05$); *Teste de Kruskal-Wallis ($P>0,05$). AEE: amostras espermáticas epididimárias; AC: Androcoll-C™; SF: soro fisiológico; CONC ($\times 10^6$ spz / mL); [□] Espermatozoides amostrados: número total de espermatozoides pré (em AEE) e pós centrifugação (em AC e SF); Taxa de recuperação (%); MOT: motilidade total (%); VIG (1 – 5); Integridade funcional da membrana plasmática: avaliada pelo teste hiposmótico (HOST) (% de células reativas ao teste); DMAI (% de defeitos maiores); DMEN (% de defeitos menores); DT (% de defeitos totais).

Quanto às avaliações qualitativas não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre os parâmetros cinéticos, número de células defeituosas e integridade de membrana espermática entre as AEEs iniciais e as amostras centrifugadas quer seja com o uso de Androcoll™ ou com soro fisiológico (Tabela 1).

Após a padronização da concentração as amostras centrifugadas foram submetidas ainda à sensibilização com fluido prostático (tratamentos 1 e 3), assim, apenas o vigor espermático foi superior ($P<0,05$) naquelas amostras centrifugadas com soro fisiológico e sem o acréscimo de FP (T4) em relação aos tratamentos em que se utilizou o AC como solução centrifugadora (T1 e T2) (Tabela 2). Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferença significativa independente da solução utilizada para a centrifugação ou do acréscimo de fluido prostático (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação de amostras espermáticas epididimárias de cães centrifugadas, com adição ou não de fluido prostático, após resfriamento *in situ* e prévia ao resfriamento *ex situ*.

Parâmetro	Tratamentos			
	1	2	3	4
MOT	75,0 ± 5,3	72,5 ± 4,6	76,3 ± 5,2	78,8 ± 3,5
VIG*	3,7 ± 0,5 ^b	3,6 ± 0,4 ^b	4,0 ± 0,4 ^{ab}	4,3 ± 0,4 ^a
Integridade funcional da membrana plasmática	62,8 ± 14,7	58,6 ± 18,1	62,1 ± 16,6	71,9 ± 6,1
DMAI	5,4 ± 4,8	6,6 ± 7,7	7,3 ± 4,9	4,8 ± 3,2
DMEN	18,4 ± 10,2	20,3 ± 12,5	24,3 ± 16,5	16,0 ± 8,3
DT	23,8 ± 11,2	26,9 ± 14,2	31,5 ± 17,7	20,8 ± 8,6

Médias ± desvio padrão. ^{a-b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si. Teste de Tukey ($P > 0,05$); *Teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). MOT: motilidade total (%); VIG (1 – 5); Integridade funcional da membrana plasmática: avaliada pelo teste hiposmótico (HOST) (% de células reativas ao teste); DMAI (% de defeitos maiores); DMEN (% de defeitos menores); DT (% de defeitos totais). T1: AEE centrifugada com Androcoll-C™ (AC) ressuspensa em meio comercial de manutenção (MM) acrescido de 10 % de fluido prostático (FP); T2: AEE centrifugada com AC ressuspensa em MM acrescido de 10 % de soro fisiológico (SF); T3: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de FP e T4: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de SF.

Após 24 horas de resfriamento não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) nos parâmetros morfológicos espermáticos e de integridade de membrana espermática, independente da solução utilizada para a centrifugação ou do acréscimo de fluido prostático previamente (Tabela 3). Porém, na avaliação qualitativa cinética os tratamentos submetidos à centrifugação com SF apresentaram valores absolutos maiores que os tratamentos em que o Androcoll™ foi utilizado como solução centrifugadora, sendo observada diferença ($P < 0,05$) apenas entre a MOT registrada no tratamento centrifugado com SF sem a adição de FP (T4) em relação ao tratamento centrifugado com AC sem a adição de FP (T2), e o VIG observado no tratamento centrifugado com SF acrescido de FP (T3) em relação ao tratamento centrifugado com AC sem adição de FP (T2) (Tabela 3).

Os parâmetros qualitativos cinéticos foram avaliados quanto à longevidade espermática pelo teste de termorresistência (TTR) após o resfriamento *in situ* por 24 horas e *ex situ* por adicionais 24 horas nos diferentes tratamentos, assim, observou-se que aqueles em que se utilizou o SF na centrifugação apresentaram performance superior àqueles centrifugados com AC, independente do acréscimo do FP. Neste

sentido já a partir de 15 minutos de TTR em ao menos um dos parâmetros cinéticos foram registrados valores significativos superiores ($P < 0,05$), em especial para o tratamento submetido à centrifugação com SF sem acréscimo de FP, em relação àqueles submetidos à centrifugação com AC (Figuras 1 e 2).

Tabela 3. Avaliação de amostras espermáticas epididimárias de cães centrifugadas, com adição ou não de fluido prostático, após 24 horas de resfriamento *in situ* e adicionais 24 horas de resfriamento *ex situ*.

Parâmetro	Tratamentos			
	1	2	3	4
MOT	60,0 ± 26,2 ^{ab}	53,8 ± 22,0 ^b	77,5 ± 14,9 ^{ab}	80,0 ± 10,7 ^a
VIG*	3,8 ± 0,6 ^{ab}	3,6 ± 0,4 ^{bc}	4,2 ± 0,4 ^a	4,2 ± 0,6 ^{ac}
Integridade funcional da membrana plasmática				
DMAI	6,5 ± 4,8	6,5 ± 5,0	7,5 ± 9,4	6,1 ± 8,4
DMEN	17,6 ± 7,2	13,6 ± 5,6	21,3 ± 7,6	21,0 ± 14,1
DT	24,1 ± 6,9	20,1 ± 5,1	28,8 ± 15,0	27,1 ± 13,5

Médias ± desvio padrão. ^{a-c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si. Teste de Tukey ($P > 0,05$); *Teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). MOT: motilidade total (%); VIG (1 – 5); Integridade funcional da membrana plasmática: avaliada pelo teste hiposmótico (HOST) (% de células reativas ao teste); DMAI (% de defeitos maiores); DMEN (% de defeitos menores); DT (% de defeitos totais). T1: AEE centrifugada com Androcoll-C™ (AC) ressuspensa em meio comercial de manutenção (MM) acrescido de 10 % de fluido prostático (FP); T2: AEE centrifugada com AC ressuspensa em MM acrescido de 10 % de soro fisiológico (SF); T3: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de FP e T4: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de SF.

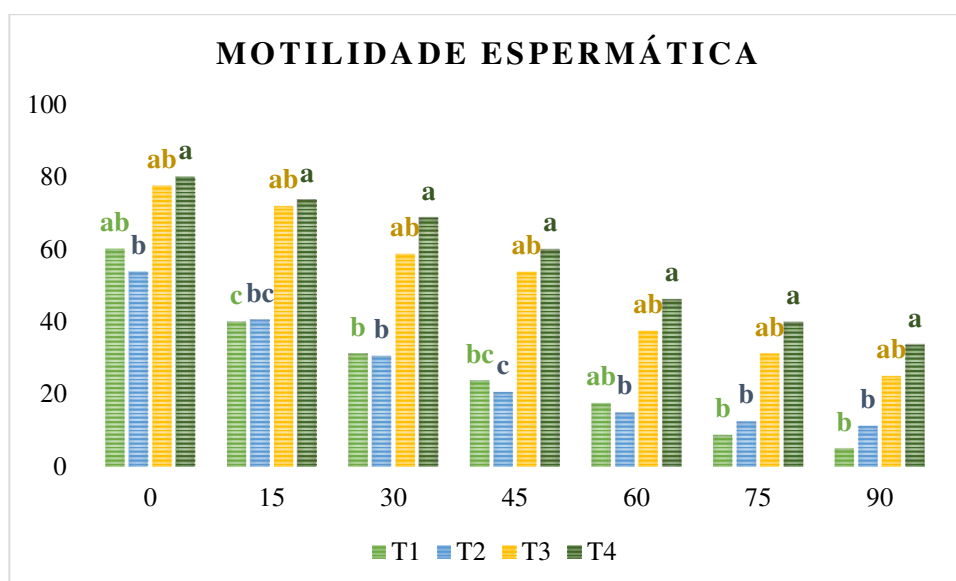


Figura 1. Médias de motilidade espermática durante o teste de termorresistência em amostras epididimárias de cães centrifugadas, com adição ou não de fluido prostático, reaquecidas após 24 horas de resfriamento *in situ* e adicionais 24 horas de resfriamento *ex situ*. T1: AEE centrifugada com Androcoll-CTM (AC) ressuspensa em meio comercial de manutenção (MM) acrescido de 10 % de fluido prostático (FP); T2: AEE centrifugada com AC ressuspensa em MM acrescido de 10 % de soro fisiológico (SF); T3: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de FP e T4: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de SF.

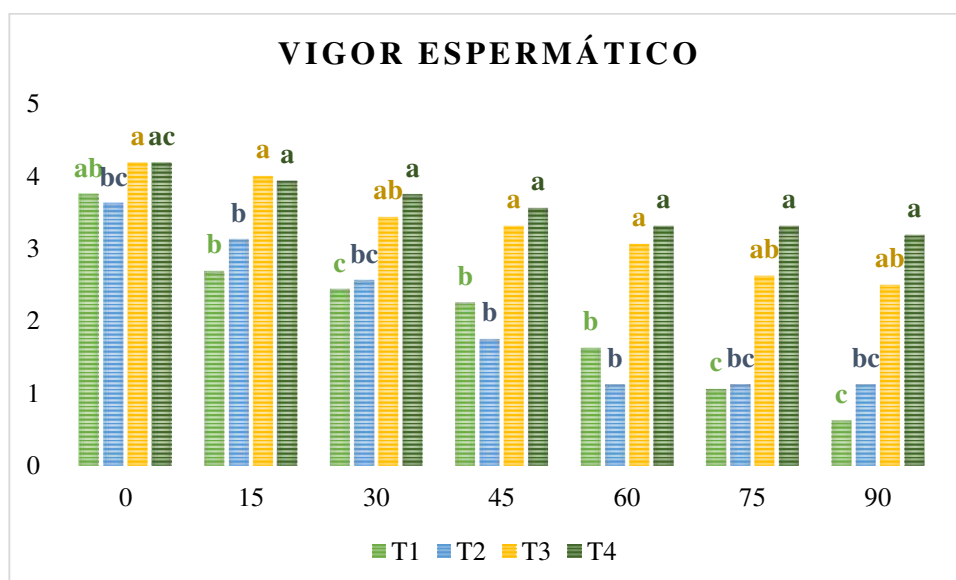


Figura 2. Médias de vigor espermático durante o teste de termorresistência em amostras epididimárias de cães centrifugadas, com adição ou não de fluido prostático, reaquecidas após 24 horas de resfriamento *in situ* e adicionais 24 horas de resfriamento *ex situ*. T1: AEE centrifugada com Androcoll-CTM (AC) ressuspensa em meio comercial de manutenção (MM) acrescido de 10 % de fluido prostático (FP); T2: AEE centrifugada com AC ressuspensa em MM acrescido de 10 % de soro fisiológico (SF); T3: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de FP e T4: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de SF.

Após 72 horas de resfriamento *ex situ* foram realizadas novas avaliações espermáticas, nas quais foram observadas, nos parâmetros qualitativos cinéticos, que os tratamentos submetidos à centrifugação com SF continuaram apresentando valores absolutos maiores que os tratamentos centrifugados com Androcoll™. Porém, apenas o VIG registrado no tratamento centrifugado com SF e com adição de FP (T3), apresentou diferença significativa ($P<0,05$) quando comparado aos tratamentos centrifugados com AC independente da adição ou não de FP (T1 e T2) (Tabela 4).

A integridade de membrana plasmática entre os diferentes tratamentos não apresentou diferença significativa independente da solução utilizada na centrifugação ou do acréscimo de FP, após 72 horas de resfriamento (Tabela 4). Porém, em relação à presença de espermatozoides defeituosos não foram observadas diferenças significativas ($P<0,05$) entre os tratamentos centrifugados com Androcoll™, independente do acréscimo de FP, da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas ($P<0,05$) entre os tratamentos centrifugados com SF, independente do acréscimo de FP. No entanto, quando se avalia o efeito especificamente do AC sobre o percentual de defeitos maiores, menores e totais observa-se que, ao menos um destes tratamentos, apresentaram valores médios significativamente menores ($P<0,05$) em relação aos tratamentos utilizando-se SF como solução centrifugadora (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação de amostras espermáticas epididimárias de cães centrifugadas, com adição ou não de fluido prostático, após 24 horas de resfriamento *in situ* e adicionais 72 horas de resfriamento *ex situ*.

Parâmetro	Tratamentos			
	1	2	3	4
MOT	40,0 ± 32,1	28,8 ± 28,5	58,8 ± 25,3	55,0 ± 25,6
VIG*	2,3 ± 1,5 ^c	2,4 ± 1,5 ^{bc}	3,6 ± 0,4 ^a	3,5 ± 0,5 ^{ab}
Integridade funcional da membrana plasmática				
DMAI	8,5 ± 5,5 ^b	12,4 ± 6,2 ^{ab}	12,1 ± 7,0 ^{ab}	19,3 ± 9,6 ^a
DMEN	11,4 ± 5,7 ^{ab}	7,4 ± 2,5 ^b	19,9 ± 12,4 ^a	17,1 ± 8,5 ^a
DT	19,9 ± 7,3 ^b	19,8 ± 6,2 ^b	32,0 ± 11,6 ^{ab}	36,4 ± 11,8 ^a

Médias ± desvio padrão. ^{a-c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si. Teste de Tukey ($P > 0,05$); *Teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). MOT: motilidade total (%); VIG (1 – 5); Integridade funcional da membrana plasmática: avaliada pelo teste hiposmótico (HOST) (% de células reativas ao teste); DMAI (% de defeitos maiores); DMEN (% de defeitos menores); DT (% de defeitos totais). T1: AEE centrifugada com Androcoll-C™ (AC) ressuspensa em meio comercial de manutenção (MM) acrescido de 10 % de fluido prostático (FP); T2: AEE centrifugada com AC ressuspensa em MM acrescido de 10 % de soro fisiológico (SF); T3: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de FP e T4: AEE centrifugada com SF ressuspensa em MM acrescido de 10 % de SF.

4. DISCUSSÃO

A preservação dos espermatozoides da cauda de epidídimo pode ser realizada coletando as AEEs para serem refrigeradas ou congeladas, ou refrigerando-se os conjuntos testículo-epidídimo-ducto deferente por tempo determinado, com recuperação espermática posterior, sendo a viabilidade espermática após estas metodologias, variável entre as espécies (Bergstein-Galan et al., 2017). Embora Yu & Leibo (2002) relatem que os espermatozoides quando ejaculados e mantidos posteriormente sob refrigeração são mais resistentes daqueles armazenados refrigerados *in situ*, vários dias após a morte de um animal (± 8 dias) ainda é possível recuperar AEEs com MOT e integridade de membranas aceitáveis, para uso em tecnologias de reprodução assistida em caninos, com potencial uso em espécies ameaçadas de extinção (Yu & Leibo, 2002). Armas et al. (2011) realizando o resfriamento espermático *in situ* observou queda progressiva nos parâmetros qualitativos ao longo de 72 horas de armazenamento dos epidídimos, mesmo assim,

após 72 horas de resfriamento as AEEs obtidas apresentavam MOT de 52 % e integridade de membrana espermática de 68,9 %. No presente trabalho os epidídimos foram resfriados após a castração por 24 horas antes da obtenção das AEEs, sendo os resultados qualitativos cinéticos e de integridade de membrana espermática semelhantes àqueles descritos por Armas et al. (2011) no mesmo período.

O presente estudo objetivou verificar ainda, a qualidade de amostras espermáticas epididimárias usando a técnica de fluxo retrógrado, submetidas a um processo de seleção espermática através de centrifugação em camada única com coloide e avaliar o efeito da sensibilização das amostras epididimárias com fluido prostático, com posterior resfriamento por até 72 horas.

Tem sido relatado que o número total de espermatozoides após a recuperação epididimária depende, além da técnica utilizada para coletar a amostra (Varesi et al., 2014; Pennacchisavi et al., 2015; Bergo, 2018), do volume testicular do animal (Batista et al., 2016). No presente trabalho a coleta espermática epididimária foi realizada com perfusão de meio Nutricell® e perfusão adicional de ar finalizando o fluxo retrógrado, com o intuito de se obter o maior número total de espermatozoides possíveis (Silva et al., 2018) permitindo ainda a obtenção de amostras límpidas e melhor acompanhamento da totalidade da perfusão. Foram, portanto, recuperados em média $638,6 \times 10^6$ de espermatozoides totais por cauda do epidídimo, valor superior ao registrado por Hori et al. (2015) ($595,8 \times 10^6$) com o uso de fluxo retrógrado sem o uso adicional de perfusão com ar.

A centrifugação convencional objetiva concentrar os espermatozoides de uma amostra original em um pellet, separando assim as células da maior parte do plasma seminal, porém, perdas durante este processo são inerentes, Rijsselaere et al. (2002) relatam que estas perdas são inversamente proporcionais à intensidade da centrifugação, assim, utilizando sêmen canino, observaram que a 720 g por 5 minutos, a perda no número total de espermatozoides por centrifugação gira em torno de apenas 2,3 %. Porém, no presente trabalho, com o uso de amostras espermáticas epididimárias, apenas 38 % dos espermatozoides foram recuperados após centrifugação convencional, valores próximos são relatados por Dorado et al. (2015) também em sêmen canino.

Por outro lado, no processo centrifugação convencional, não ocorre uma seleção baseada na boa qualidade espermática, por tanto, células mortas, anormais,

bem como fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS), prejudiciais para a sobrevivência dos espermatozoides, são também agregadas no pellet (Valeanu & Drugociu, 2014; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2016). Embora Mascarenhas & Paula (2018) relatem uma queda significativa entre 13 e 14% dos parâmetros cinéticos de amostras seminais caninas após a centrifugação convencional, no presente experimento não foram observadas reduções significativas nos parâmetros qualitativos observados após centrifugação convencional das AEEs. Já a centrifugação em camada única através de um coloide (SLC) é uma técnica que permite que uma subpopulação de espermatozoides com morfologia normal, membranas intactas e com boa integridade de cromatina sejam separados do resto do ejaculado, incluindo o plasma seminal (Morrell, 2016).

Gálvez et al. (2015) relatam que a recuperação espermática após técnica de seleção espermática por SLC depende da qualidade espermática da amostra original. A taxa de recuperação média obtida no presente estudo com uso de AEEs após a SLC com Androcoll-C™ foi de apenas 18 %, valores menores que os descritos por esses autores quando a SLC foi aplicada ao sêmen de cães (49,59 %). Segundo Morrell (2011) e Urbano et al. (2013) ao contrário do observado com a centrifugação tradicional, a SLC permite eliminar fontes de ROS (como restos celulares, leucócitos, células epiteliais e espermatozoides mortos), melhorando assim a longevidade dos espermatozoides durante a criopreservação. Porém no presente trabalho não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros qualitativos analisados após SLC, em comparação à amostra centrifugada convencionalmente e mesmo entre estas e a AEE inicial.

Korochkina et al. (2014) observaram que o fluido prostático adicionado a espermatozoides epididimários de cães, melhora a cinemática destes quando avaliados a fresco, mostrando nesta circunstância, um efeito ativador do fluido sobre os espermatozoides. Também, Nöthling et al. (2007) relatam que a adição de FP a 20% melhora significativamente a MOT progressiva ($P < 0,05$) em amostras espermáticas epididimárias. Porém no presente trabalho, independente do acréscimo de 10 % de FP, ao meio de ressuspensão das amostras centrifugadas, seja com o uso de SLC seja com o uso de SF, nenhuma diferença significativa foi observada nos parâmetros qualitativos analisados, ao contrário, apenas o VIG naquelas amostras centrifugadas com SF sem

o acréscimo de FP (T4), apresentou valores superiores em relação às amostras centrifugadas com SLC.

No presente trabalho, após 24 horas de resfriamento *in situ*, as amostras espermáticas epididimárias foram obtidas e processadas nos quatro tratamentos descritos, e após 24 horas de resfriamento adicional *ex situ* não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) nos parâmetros morfológicos espermáticos e de integridade de membrana espermática, independente da solução utilizada para a centrifugação ou do acréscimo de fluido prostático previamente. Semelhante a isto, Armas et al. (2011) descrevem que também não foram observadas diferenças significativas no percentual de integridade de membrana espermática e parâmetros qualitativos cinéticos durante as primeiras 48 horas, embora somente sob manutenção espermática epididimária *in situ*. Da mesma forma Ponglowhapan et al. (2006) descrevem o mesmo comportamento dos valores de integridade de membrana espermática durante as primeiras 48 horas, porém sob refrigeração somente *ex situ*. No entanto Yu & Leibo (2002) e Ponglowhapan et al. (2006) descrevem diminuição significativa nos parâmetros qualitativos cinéticos durante as primeiras 48 horas de refrigeração *in situ* e *ex situ* respectivamente.

No presente trabalho a avaliação qualitativa cinética após 24 horas de resfriamento *in situ* e 24 horas de resfriamento *ex situ* observa-se que os tratamentos submetidos à centrifugação com SF apresentaram valores absolutos maiores que os tratamentos em que o Androcoll™ foi utilizado como solução centrifugadora, independente da adição do fluido prostático. Melo et al. (2010) também não observaram efeito do fluido prostático homólogo sobre as características físicas de AEEs criopreservadas ($P>0,05$). Quanto à longevidade espermática a qualidade cinética no presente trabalho foi também melhor preservada naquelas amostras centrifugadas com SF. Neste sentido já partir de 15 minutos de TTR, em ao menos um dos parâmetros cinéticos, foram registrados valores superiores ($P<0,05$), em especial, para o tratamento submetido à centrifugação com SF sem acréscimo de FP (T4) em relação àqueles submetidos à centrifugação com AC (T1 e T2).

Gálvez et al. (2015) e Dorado et al. (2015) descreveram que após 72 horas o sêmen canino resfriado e previamente submetido a técnicas de centrifugação convencional e SLC, não apresentaram diferença ($P>0,05$) na motilidade espermática. No presente trabalho, após 24 horas de resfriamento *in situ* e 72 horas de resfriamento

ex situ, os tratamentos submetidos à centrifugação com SF continuaram apresentando valores absolutos maiores que os tratamentos centrifugados com Androcoll™. Porém, apenas o VIG registrado no tratamento centrifugado com soro e com adição de FP (T3) apresentou diferença ($P < 0,05$) quando comparado aos tratamentos centrifugados com AC, independente da adição ou não de FP (T1 e T2).

Amostras seminais caninas submetidas à técnica de SLC apresentaram integridade de membrana plasmática maiores que amostras centrifugadas convencionalmente e resfriadas por 72 horas ($P < 0,05$) (Gálvez et al., 2015). Já Dorado et al. (2015), não observaram diferenças nas mesmas condições ($P > 0,05$). No presente trabalho a integridade de membrana plasmática entre os diferentes tratamentos não apresentou diferença ($P > 0,05$) independente da solução utilizada na centrifugação ou do acréscimo de FP após 72 horas de resfriamento *ex situ*. Porém, em relação à presença de espermatozoides defeituosos, não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre os tratamentos centrifugados com Androcoll™, independente do acréscimo de FP, da mesma forma, não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre os tratamentos centrifugados com SF, independente do acréscimo de FP. Do mesmo modo relatado por Dorado et al. (2015) e Gálvez et al. (2015), em amostras seminais resfriadas por 72 horas, a SLC parece exercer algum efeito preventivo ao aumento do percentual de células defeituosas evidenciado no presente trabalho após 72 horas de resfriamento *ex situ*.

5. CONCLUSÃO

A técnica de fluxo retrógrado usando a perfusão de meio com adição de ar permite o acompanhamento da completa perfusão para obtenção de amostras espermáticas epididimárias caninas com características qualitativas e quantitativas aceitáveis para a espécie.

A taxa de recuperação após centrifugação convencional em presença de soro fisiológico é maior do que a obtida após centrifugação em camada única através de coloide.

Os efeitos da centrifugação em camada única através de coloide em amostras espermáticas epididimárias de cães são perceptíveis quanto à prevenção de aumento do percentual de patologias espermáticas após 72 horas de resfriamento.

O acréscimo de 10 % de fluido prostático no meio de manutenção não apresenta efeitos significantes em amostras espermáticas epididimárias caninas nas condições amostradas.

Amostras espermáticas epididimárias mantidas resfriadas por 24 horas *in situ* e, adicionalmente por até 72 horas *ex situ* apresentam parâmetros qualitativos cinéticos, de integridade de membrana plasmática e de morfologia espermática, compatíveis para utilização em programas de reprodução assistida em cães domésticos, com uso potencial em carnívoros silvestres.

6. REFERÊNCIAS

ANEL-LÓPEZ, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; SOLER, A. J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; GARDE, J. J.; MORRELL, J. M. Use of Androcoll-S after thawing improves the quality of electroejaculated and epididymal sperm samples from red deer. **Animal Reproduction Science**, v. 158, p. 68–74. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.04.009>

ARMAS, R. S.; FERNÁNDEZ, A. V.; VÁSQUEZ, C. M.; SANTIANI, A. A.; Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía. **Rev Inv Vet Perú**, v. 22, n. 3, p. 199-205. 2011. DOI: 10.15381/rivep.v22i3.257

ASSUMPÇÃO, T. I.; SANTOS, A. L. Q.; MACEDO, G. G.; PEIXOTO, L. R.; ZAMPINI, A. C. A. Coleta e avaliação morfológica dos espermatozoides epididimários de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer. **Anais... VIII Encontro sobre Animais Selvagens. III Simpósio sobre Medicina e Conservação da Fauna do Cerrado – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG**, p. 49-54. 2016.

BAGER, A. **Sumário executivo da estratégia nacional para a mitigação de impactos da infraestrutura viária na biodiversidade**. 2017. Documento concebido pelo Centro Brasileiro de Estudos em Ecologia de Estradas (CBEE) vinculado a Universidade Federal de Lavras. 19 p. 2017.

BATISTA, M.; VILAR, J.; ROSARIO, I.; TERRADAS, E. Influence of different anaesthetic protocols over the sperm quality on the fresh, chilled (4°C) and frozen-thawed epididymal sperm samples in domestic dogs. **Reprod Dom Anim.**, p. 1–8. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12743>

BENÍTEZ, G. E.; CHAMBA, H.; LUZÓN, C. F.; SÁNCHEZ, C. J. Comparative evaluation of two methods of spermatic recovery of post-mortem bovine epididymis. **Abanico veterinario**. v. 8, n. 1, p. 59-74. 2018. DOI: 10.21929/abavet2018.81.6

BERGO, L. C. F. (em preparação). **Comparação de técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários em cães**. 2018. p. 36. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Área Morfofisiologia dos animais domésticos e selvagens - Universidade Federal de Viçosa, 2018.

BERGSTEIN-GALAN, T. G.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; BICUDO, S. D. Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 41, n. 3, p.659-664. 2017.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinärer Medicin.**, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1973.

BURANAAMNUAY, K. Cryopreservation and storage of cat epididymal sperm using -75 °C freezer vs liquid nitrogen. **Animal Reproduction Science**, v. 191, p. 56–63. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.008>

CARAZO L. R. B.; DECO, T. S.; ARAÚJO, G. R.; BERGO, L. C. F.; PAULA, T. A. R. MALACARNE, J. M.; TEIXEIRA, F. R. C.; ZERLOLTINI, M. F. **Evaluation of canine semen by the hypo-osmotic swelling test**. In: International Symposium on Animal Biology of Reproduction. 5., 2014, Campinas, **Anais...** Campinas – SP: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2015. p. 184

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA, 104p. 2013.

CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; MORRELL, J. M. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 1284–1292. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.009>

DORADO, J.; GÁLVEZ, M. J.; MORRELL, J. M.; ALCARÁZ, L.; ORTIZ, I.; ACHA, D.; HIDALGO, M. Use of Single Layer Centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. **Theriogenology in press**, v. 80, p. 955–962. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.027>

DORADO, J.; GÁLVEZ, M. J.; DEMYDA-PEYRÁS, S.; ORTIZ, I.; MORRELL, J. M.; CRESPO, F.; GÓSSALVEZ, J.; HIDALGO, M. Differences in preservation of canine chilled semen using simple sperm washing, single-layer centrifugation and modified swim-up preparation techniques. **Reproduction Fertility and Development**, v. 28, n.10. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD15071>

DURRANT, B. Semen Collection, Evaluation, and Cryopreservation in Exotic Animal Species: Maximizing Reproductive Potential. **Ilar Journal**, v. 32, n. 1, p. 1-10. 1990. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.32.1.2>

ELLERBROCK, R. E.; PRELL, M.; STEWART, J. L.; BOJKO, M. S.; LIMA, F. S.; CANISSO, I. F. Comparison of centrifugation and non-centrifugation methods to cryopreserve stallion epididymal sêmen. **Journal of Equine Veterinary Science**.v. 50, p. 27-32. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.11.005>

GÁLVEZ, M. J.; ORTIZ, I.; HIDALGO, M.; MORRELL, J. M.; DORADO, J. Should single layer centrifugation of dog semen be done before or after the semen is cooled? **Vet Rec.**, v. 176, n. 14, p. 359. 2015. DOI: [10.1136/vr.102806](https://doi.org/10.1136/vr.102806)

GILMORE, D. P.; HOOKER, R. H.; CHANG, M. C. A technique for the collection by fistula of epididymal spermatozoa from the rat. **J Reprod Fertil.**, v. 25, n. 1, p. 137-40. 1971.

HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Royal Microscopic Society**, v. 76, p. 84-97. 1957. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1956.tb00443.x>

HORI, T.; ATAGO, T.; KOBAYASHI, M.; KAWAKAMI, E. Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality, **J. Vet. Med Sci.**, v. 77, n. 5, p. 625–630. 2015. DOI: 10.1292/jvms.14-0421.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2018-2. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10/10/2018.

JEWGENOW, K.; BRAUN, B.C.; DEHNHARD, M.; ZAHMEL, J.; GOERITZ, F.; Research on reproduction is essential for captive breeding of endangered carnivore species. **Reprod Dom Anim.**, v. 52 (Suppl. 2), p. 18–23. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12836>

KOROCHKINA, E.; JOHANNISSON, A.; LAVANYA GOODLA; MORRELL, J.M.; AXNER, E. Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozen-thawed canine epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 82, p. 1206–1211. 2014. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.06.024

LUVONI, G.C.; KALCHSCHMIDT, E.; LEONI, S.; RUGGIERO, C. Conservation of feline semen – part I: cooling and freezing protocols. **J. Feline Med. Surg.**, v.5, p.203-8. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1098-612X\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S1098-612X(03)00029-9)

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL. L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, p. 471–485, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.045>

MASCARENHAS, R. M. & PAULA, T. A. R. Effects of the low intensity centrifugation and the breed on the quality of fresh canine semen. **Journal of Veterinary Andrology**, v. 3, n. 1. 2018.

MELO, M. I. V. & HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 71-78. 1999.

MELO, M. I. V.; OLIVEIRA, J. V. S.; VALLE, G. R.; RACHID, M. A.; SOARES, F. C. G.; MATOS, J. J. R. T. Efeito da centrifugação e do líquido prostático homólogo na criopreservação de espermatozoides epididimários caninos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n .3, p. 603-608. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000300015>

MORRELL, J. M. **Artificial Insemination: Current and Future Trends, Artificial Insemination in Farm Animals**. Ed. Dr. Milad Manafi, ISBN: 978-953-307-312-5, InTech, DOI: 10.5772/17943. Available from: <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-current-and-future-trends>. 2011.

MORRELL J. **Colloids: Applications in Sperm Preparation for Assisted Reproduction**. 2016. DOI: 10.5772/64898. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-colloid-science/colloids-applications-in-sperm-preparation-for-assisted-reproduction>. Acesso em: 02 de outubro de 2018.

MORRELL, J. M.; NÚÑEZ-GONZÁLEZ, A.; CRESPO-FÉLEZ, I.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, S.; MARTÍNEZ ALBORCIA, M. J.; FERNÁNDEZ-ALEGRE, E.; DOMINGUEZ, J.C.; GUTIÉRREZ-MARTÍN, C.B.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Removal of bacteria from boar semen using a low-density colloid. **Theriogenology**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.028>

MORRELL, J.M. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloid Centrifugation of Semen: Applications in Assisted Reproduction. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 7, p. 597-610. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2016.78055>

MORRIS L, TIPLADY C, ALLEN WR. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. **Theriogenology**, v. 58, p. 643–6. 2002. DOI: [10.1016/S0093-691X\(02\)00742-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00742-2)

MUÑOZ-FUENTES, V.; FORSBERG, C. L.; VILÀ, C. MORRELL, J. M. Single-layer centrifugation separates spermatozoa from diploid cells in epididymal samples from gray wolves, *Canis lupus* (L.) **Theriogenology**, n. 82, p. 773–776. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.029>

NOAKES, D. E. et al. **Arthur's veterinary reproduction and obstetrics**. 8.ed. China Saunders: Elsevier. 2006. 868p.

NÖTHLING, J. O.; SHUTTLEWORTH, R.; DE HAAS, K.; THOMPSON, P. N. Homologous prostatic fluid added to frozen–thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. **Theriogenology**, v. 64, p. 975–991. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.002>

NÖTHLING, J. O.; GERBER, D.; COLENBRANDER, B.; DIJKSTRA, M.; BAKKER, T.; DE CRAMER, K. The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed. **Theriogenology**, v. 67, p. 264–275. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000300015>

OLIVO-ZEPEDA, I. B.; TOSCANO-TORRES, I. A.; TENA-MARTÍNEZ, M. J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; CONEJO-NAVA, J. Conservación de semen canino mediante vitrificación y congelamiento lento. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. In: XXII ENCUENTRO DE INVESTIGACIÓN VETERINARIA Y PRODUCCIÓN ANIMAL, 2011, México. **Anais eletrônicos**. Disponível em: <http://www.vetzoo.umich.mx/phocadownload/Noticias/xxiiencuentrodeinvestigacion/14%20-20conservacion%20de%20semen%20canino%20mediante%20vitrificacion%20y%20congelamiento%20lento.pdf>. Acesso em: 20/09/2013.

PENNACCHISAVI, P. P. A; MOTHEO, T. F.; NAKAGHI, L. C. P.; BUTTLER, E. P.; VICENTE, W. R. R. Técnica modificada de compressão do ducto deferente e cauda do epidídimo para obtenção de espermatozoides caninos. **Revista Investigação Medicina Veterinária**, v. 14, n. 1, p. 1-7. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.26843/investigacao.v14i1.835>

PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K.; SIRIVAIIDYAPONG, S.; LOHACHIT, C. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. **Theriogenology**, v. 66, p. 1633–1636. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.032>

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1669-81. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00663-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00663-5)

SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT® 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SILVA, T.; DINIZ, P.; BERGO, L.; CARAZO, L. R. B.; PAULA, T. A. R.; MATEUS, L. Comparison of three techniques of Spz collection from the tail of epididymis in the dog. **Proceedings... 21th European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR) Congress Venice Italy - June 22nd-23rd. 2018.**

URBANO, M.; DORADO, J.; ORTIZ, I.; MORRELL, J.M.; DEMYDA-PEYRÁS, S.; GÁLVEZ, M. J.; ALCARAZ, L.; RAMÍREZ, L.; HIDALGO, M. Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test. **Anim Reprod Sci.**, v. 143, n. 1-4, p. 118-25. 2013. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.10.005

VALEANU, S. N.; DRUGOCIU, D. Biomimetic technologies - usefull tool in conservation of endangered species. **International Journal of Conservation Science**, v. 5, n. 3, p. 409-418. 2014.

VARESI, S.; VERNOCCHI, V.; MORSELLI, M. G.; LUVONI, G. C. DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa. **Reproductive biology**, v. 14, p. 257 – 261. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2014.07.001>

YU, I; LEIBO, S. P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymis stored for 8 days at 4°C. **Theriogenology**, v. 57, p. 1179-1190. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00711-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00711-7)

CONCLUSÕES GERAIS

A técnica de *swim-up* modificado com adição do coloide Androcoll-C™ usado como filtro de seleção espermática, independente do formato e inclinação do tubo de migração, não melhora os parâmetros cinéticos espermáticos, nem influencia as taxas de recuperação espermática ou a integridade celular, quando realizada em sêmen canino fresco de boa qualidade; permitindo apenas, a obtenção de um número menor de patologias espermáticas, quando realizada a técnica em tubo de migração de base arredondada inclinado 45°, após renovação de meio no tubo de migração com recuperação e avaliação aos 30 minutos. Assim, esta técnica poderia ser testada em sêmen de qualidade inferior e em protocolos de resfriamento e congelamento, com o intuito de verificar se a seleção espermática ocorre de forma mais evidente.

A técnica de fluxo retrógrado para recuperação de espermatozoides caninos quando realizada mediante perfusão de soro fisiológico ou meio de manutenção comercial com adição de ar, não altera a qualidade imediata da amostra; porém, recomenda-se armazenar as amostras em meio durante o resfriamento por 24 horas, para preservação de características espermáticas desejáveis e douradoras, não havendo necessidade da adição de fluido prostático a 10 % ao meio de manutenção para melhor preservação dos parâmetros qualitativos espermáticos.

A taxa de recuperação após centrifugação convencional em presença de soro fisiológico é maior do que a obtida após centrifugação em camada única através de coloide, porém, a SLC previne o aumento do percentual de patologias espermáticas após 72 horas de resfriamento nas amostras espermáticas epididimárias; já o acréscimo de 10 % de fluido prostático no meio de manutenção não apresenta efeitos significantes nas amostras após resfriamento; no entanto, os parâmetros qualitativos cinéticos, de integridade de membrana plasmática e de morfologia espermática observados nas amostras espermáticas epididimárias refrigeradas por 24 horas *in situ* e, adicionalmente por até 72 horas *ex situ* apresentam valores compatíveis para utilização em programas de reprodução assistida em cães domésticos, com uso potencial em carnívoros silvestres.