

**REBECA MARQUES MASCARENHAS**

**RENOVAÇÃO DO DILUIDOR NA QUALIDADE DO  
SÊMEN CANINO RESFRIADO**

Tese apresentada à UFMG, como requisito  
parcial para obtenção do grau de Doutor em  
Ciência Animal, na área de Reprodução Animal.  
Orientador: Prof. Antônio de Pinho M. Júnior

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária – UFMG**  
**2012**

M395r Mascarenhas, Rebeca Marques, 1982-  
Renovação do diluidor na qualidade do sêmen canino resfriado / Rebeca Marques  
Mascarenhas. – 2012.  
54 p. : il.

Orientador: Antônio de Pinho M. Júnior  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Cão – Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Análise – Teses. 3. Sêmen – Resfriamento –  
Teses. 4. Reprodução animal – Teses. I. Marques Júnior, Antônio de Pinho.  
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 926

Tese defendida e aprovada em 18 de maio de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



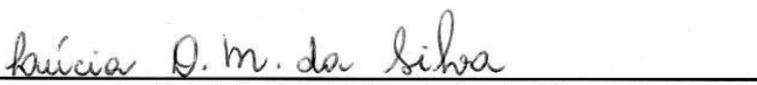
---

Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior  
Presidente



---

Profª. Mariana Machado Neves



---

Profª. Lúcia Daniel Machado da Silva



---

Profª. Erika Christina Santos Oliveira



---

Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho



Cada um de nós compõe a sua própria história,  
Cada ser carrega em si o dom de ser capaz  
E ser feliz  
*(Almir Sater)*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Pinho gostaria de agradecer, não só pela orientação e trabalho conjunto, que foram fundamentais para a confecção desta tese, mas acima de tudo por estes quatro anos de convívio. Um convívio que foi decisivo para minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Agradeço ao Professor por ter sido um porto seguro nos períodos mais tempestuosos e um exemplo sempre!

Aos Professores José Monteiro, Marc Henry e Vicente do Valle agradeço por terem me mostrado quão fascinante é a Reprodução, como o conhecimento na área é vasto e como, contraditoriamente, nós mal começamos a entendê-la.

À Patrícia agradeço pelo companheirismo, pelo jeito gentil de ser e pelo apoio durante o experimento. Pat, não sei o que teria feito sem você!

A todos os amigos do GruPinho, e em especial a Raquel, Leo, Clara, Rafa e Paulo agradeço o companheirismo e os muitos almoços, cafés e lanche que foram sempre tão divertidos.

As amigas Telma e Betina agradeço pelo tempo que passamos juntas, pelos muitos desabafos e por todas as horas felizes. Vocês fizeram essa caminhada muito mais leve.

A Alexia e Daniel do canil Zous agradeço por ter me acolhido com todo carinho e amizade.

Aos meus pais e irmão, agradeço o apoio incondicional, não só durante o doutorado, mas para a vida toda.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> -----	11
<b>ABSTRACT</b> -----	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> -----	13
<b>2 HIPÓTESES</b> -----	13
<b>3 OBJETIVOS</b> -----	13
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b> -----	15
4.1 COLETA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN CANINO-----	15
4.2 RESFRIAMENTO DE SÊMEN E CHOQUE FRIO-----	17
4.3 MEIOS DILUIDORES-----	19
4.3.1 Macromoléculas Proteicas e o Choque Frio-----	20
4.3.2 Açúcares e Metabolismo Energético-----	20
4.3.3 pH-----	23
4.3.4 Antioxidantes e Lipoproteínas-----	23
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	25
5.1 ANIMAIS-----	25
5.2 COLETA DE SÊMEN-----	25
5.3 PROCESSAMENTO DO SÊMEN-----	25
5.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN-----	27
5.4.1 Volume do ejaculado, concentração espermática por mL de sêmen, concentração total de espermatozoides no ejaculado-----	27
5.4.2 Motilidade Espermática-----	27
5.4.3 Integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides-----	28
5.4.4 Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça e acrossoma-----	28
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	28
<b>6 EXPERIMENTO 1: A RENOVAÇÃO DO MEIO DILUIDOR NA QUALIDADE DO SÊMEN CANINO RESFRIADO</b> -----	29
6.1 RESUMO-----	29
6.2 ABSTRACT-----	29
6.3 INTRODUÇÃO-----	29
6.4 MATERIAL E MÉTODOS-----	30
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	31
6.6 CONCLUSÃO-----	36
6.7 REFERENCIAS-----	36

<b>7</b>	<b>EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DE EJACULADOS INDIVIDUAIS E POOLS DE SÊMEN CANINO RESFRIADO, SUBMETIDOS ÀS MESMAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS</b> -----	<b>37</b>
7.1	RESUMO-----	37
7.2	ABSTRACT-----	37
7.3	INTRODUÇÃO-----	37
7.4	MATERIAL E MÉTODOS-----	38
7.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	39
7.6	CONCLUSÃO-----	41
<b>8</b>	<b>EXPERIMENTO 3: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM FRUTOSE SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CANINO RESFRIADO</b> -----	<b>42</b>
8.1	RESUMO-----	42
8.2	ABSTRACT-----	42
8.3	INTRODUÇÃO-----	42
8.4	MATERIAL E MÉTODOS-----	43
8.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	43
8.6	CONCLUSÃO-----	46
8.7	REFERÊNCIAS-----	46
<b>9</b>	<b>RESULTADOS COMPLEMENTARES: PARÂMETROS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DO SÊMEN CANINO FRESCO E A INFLUÊNCIA DE UM CURTO INTERVALO ENTRE COLETAS SOBRE A QUALIDADE DO EJACULADO</b> -----	<b>47</b>
9.1	RESUMO-----	47
9.2	ABSTRACT-----	47
9.3	INTRODUÇÃO-----	47
9.4	MATERIAL E MÉTODOS-----	48
9.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	48
9.6	CONCLUSÃO-----	50
9.7	REFERÊNCIAS-----	50
<b>10</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> -----	<b>51</b>
<b>11</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>52</b>

---

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1 - Média + Desvio Padrão da porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, lentos progressivos, progressivos totais, móveis não progressivos, móveis totais e imóveis, de seis ejaculados caninos resfriados por 14 dias, antes (\*) e após (\*\*) a centrifugação e ressuspensão em meio diluidor recém preparado (T-1: dias 6 e 12; T-2: dia 12), ou centrifugação e ressuspensão no meio diluidor original (T-2 dia 6)-----33
- Tabela 2 - Média + Desvio Padrão da porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, lentos progressivos, progressivos totais, móveis não progressivos, móveis totais e imóveis, de seis ejaculados caninos resfriados por 14 dias.-----33
- Tabela 3 - Média de porcentagem de espermatozoides móveis progressivos e móveis totais no sêmen de dois cães, resfriado por 14 dias e submetido à renovação periódica do meio diluidor a cada 6 dias.-----34
- Tabela 4 - Média + Desvio Padrão da porcentagem de espermatozoides íntegros, semi-lesados e lesados, avaliados pela coloração com PI/CFDA, média de espermatozoides reativos ao Teste Hiposmótico e linearidade e retilinearidade espermáticas, de seis ejaculados caninos resfriados por 14 dias, antes (\*) e após (\*\*) a centrifugação e ressuspensão em meio diluidor recém preparado (T-1: dias 6 e 12; T-2: dia 12), ou centrifugação e ressuspensão no meio diluidor original (T-2 dia 6) .-----35
- Tabela 5 - Média + Desvio Padrão da porcentagem de espermatozoides íntegros, semi-lesados e lesados, avaliados pela coloração com PI/CFDA, média de espermatozoides reativos ao Teste Hiposmótico e linearidade e retilinearidade espermáticas, de seis ejaculados caninos resfriados por 14 dias. -----35
- Tabela 6 - Média + Desvio Padrão da porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, progressivos totais e móveis totais e imóveis de *pools* de sêmen e ejaculados individuais caninos resfriados por 14 dias, antes e após o tratamento de centrifugação e ressuspensão em meio diluidor recém preparado (T-1: dias 6 e 12; T-2: dia 12), ou centrifugação e ressuspensão no meio diluidor original (T-2 dia 6) .-----40
- Tabela 7- Média + desvio padrão da porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, progressivos totais, e móveis totais de *pools* de sêmen e ejaculados individuais canino resfriados por 14 dias e submetidos a dois tratamentos de renovação do meio diluidor.-----41
- Tabela 8- Média + desvio padrão de porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, lentos progressivos, progressivos totais, móveis não progressivos, móveis totais e imóveis, de seis *pools* de sêmen canino resfriados por 14 dias. -----44
- Tabela 9 - Média + desvio padrão de porcentagem de espermatozoides íntegros, semi-lesados e lesados, avaliados pela coloração com PI/CFDA, média de porcentagem de espermatozoides reativos ao Teste Hiposmótico, de seis *pools* de sêmen canino resfriados por 14 dias. -----45
- Tabela 10- Média + Desvio Padrão do volume do ejaculado, concentração de espermatozoides (sptz) por mL de sêmen, concentração total de espermatozoides no ejaculado, vigor e motilidade espermáticos médios, de 84 ejaculados, coletados de seis cães, dois ejaculados a cada dia de coleta, com intervalo máximo de 2-3 hora entre coletas no mesmo dia (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> coleta), e 2-3 dias entre coletas em dias diferentes. -----50

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Caixa de resfriamento de sêmen. ....	26
Figura 2 - Disposição dos componentes da caixa de resfriamento de sêmen, no tempo 0. ....	26
Figura 3 - Disposição dos componentes da caixa de resfriamento de sêmen, aos 40min. (A), e aos 70min. (B). ....	26
Figura 4 - Média da queda da temperatura do sêmen durante resfriamento em caixa de poliestireno. ....	26
Figura 5 - Foto da avaliação da motilidade espermática realizada utilizando o Sperm Class Analyser® (SCA) evidenciando os espermatozoides móveis rápidos progressivos (vermelho), móveis lentos progressivos (verde), movei não progressivos (azul) e imóveis (amarelo).....	28

## RESUMO

Investigou-se fatores que influenciam a qualidade do sêmen canino resfriado. No Experimento 1 avaliou-se o efeito da renovação do diluidor, sobre a qualidade do sêmen e verificou-se que a renovação do diluidor manteve constante a motilidade e melhorou a longevidade espermática sem influenciar a integridade das membranas espermáticas. No experimento 2 comparou-se os resultados obtidos a partir de ejaculados individuais e pools de sêmen e observou-se que a formação de pools simplifica a manipulação, por aumentar o volume do material de trabalho, mas os resultados obtidos a partir de ejaculados individuais mostraram diferenças entre tratamentos não identificadas nos pools de sêmen. No Experimento 3, avaliou-se o efeito da suplementação do diluidor com frutose sobre a qualidade do sêmen resfriado. Verificou-se que a suplementação após seis dias de resfriamento, mas não após doze dias, melhora a motilidade e a integridade de membranas espermáticas, sem influenciar a longevidade do sêmen. Nos Resultados Complementares, avaliou-se a qualidade do sêmen canino fresco, bem como o efeito de um curto intervalo entre coletas na qualidade do ejaculado. Os parâmetros quantitativos seminais variaram em até 10 vezes entre coletas de um mesmo indivíduo. Os parâmetros qualitativos variaram em cerca de 30%. O curto intervalo entre coletas não alterou a qualidade do sêmen canino fresco.

Palavras-chave: resfriamento, semen cão, meio diluidor

## ABSTRACT

We investigated factors that influence dog chilled semen quality. In Experiment 1 we evaluated the effect of medium exchange on quality of chilled dog semen and found that medium exchange sustained sperm motility and increased sperm longevity on collected dog semen, without influencing membrane integrity. In Experiment 2 we evaluated the results obtained with individual ejaculates and pooled dog semen and observed that pool semen formation made it easier to handle semen samples, mainly in respect to increase work material volume, however data obtained from individual ejaculates was able to establish differences between treatments not apparent in pooled semen data. In Experiment 3 we evaluated the effect of fructose supplementation over on chilled dog semen quality. Supplementation with fructose after six days of cooling, but not after twelve improved sperm motility and integrity sperm membranes. Sperm longevity was not affected by medium supplementation. In Additional Results we evaluate the quality of dog ejaculates collected over a month period as well as the effect of a short interval between ejaculates on semen quality. We observed a 10 fold variation in quantitative seminal parameters between collections for the same individual, and a 30% variation in qualitative parameters. The short interval between collections did not affect the parameters evaluated for dog fresh semen.

Key-words: chilled semen, dog, extender

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se visto grande crescimento na utilização de técnicas de inseminação artificial em diversas espécies domésticas, o que por sua vez fomenta o interesse em metodologias de conservação do sêmen. Comparando as duas técnicas de criopreservação de sêmen canino, o congelamento e o resfriamento, notamos que o congelamento oferece a vantagem de conservar o sêmen por períodos extremamente longos, sendo por isso mais indicado quando se objetiva o armazenamento de material genético. Já a utilização do sêmen resfriado é tecnicamente mais simples, oferece melhores resultados de fertilidade a um custo mais baixo, sendo por estes motivos mais indicado como ferramenta facilitadora do intercâmbio de material genético (England e Ponzio, 1996; Ponglowhapan et al., 2004; Peña et al., 2006).

O primeiro nascimento obtido com uso de sêmen resfriado na espécie canina data de 1954. Na ocasião Harrop descreveu uma série experimentos nos quais o sêmen era transportado de navio, da Europa até os Estados Unidos, onde ocorriam as inseminações. Nos dias atuais, o resfriamento de sêmen tem sido amplamente difundido em todo o mundo, pois além de facilitar o intercâmbio de material genético, possibilita a obtenção de bons resultados de fertilidade e prolificidade, mesmo com a deposição intra-vaginal do sêmen (Pinto et al., 1999; Peña et al., 2006).

Uma desvantagem do resfriamento de sêmen é sua longevidade relativamente baixa, inicialmente estimada em 12-24hs (Linde-Forsberg, 1991; Rota et al., 1995), e atualmente considerada de 48hs (Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005; Peña et al., 2006). O ciclo estral da cadela é caracteristicamente longo, apresentado período fértil de 2-4 dias, com acentuada variação individual na duração do estro e momento da ovulação (Linde Forsberg., 2001). Assim, a logística de coleta e envio de sêmen canino precisa ser cuidadosamente planejada de forma que este seja disponível, em boas condições, no momento adequado para inseminação. Ainda, foi demonstrado que a realização de duas inseminações, com intervalo de 48h, durante o período fértil da cadela resulta em melhores

taxas de fertilidade do uma inseminação (Linde-Forsberg et al., 1999). Tendo em vista que o ejaculado fresco contém 2-5 doses inseminantes, seria vantajoso estender a longevidade do sêmen resfriado, de forma a tornar possível utiliza-lo fracionado em mais de uma inseminação (Nizanski et al., 2009). Buscando alternativas para aumentar a longevidade do sêmen canino resfriado, Verstegen et al., (2005) observaram que a renovação do meio diluidor após longo período de armazenamento aparentemente restabeleceu a motilidade de uma parcela dos espermatozoides imóveis.

Considerando o conhecimento atual, busca-se em esclarecer o efeito da renovação do meio diluidor e da sua suplementação com frutose no período de sobrevivência do sêmen canino resfriado, na integridade dos espermatozoides e no incremento na motilidade espermática após renovação ou suplementação do meio. Buscou-se, ainda, descrever parâmetros qualitativos e quantitativos do sêmen canino fresco e a influência de um curto intervalo entre coletas sobre a qualidade do sêmen.

## 2 HIPÓTESES

- A renovação periódica do meio diluidor aumenta a longevidade e incrementa a motilidade espermática do sêmen canino diluído e resfriado, sem alterar a integridade estrutural da membrana plasmática e acrossoma;
- A suplementação periódica do meio diluidor com 4mmol/L de frutose aumenta a longevidade e incrementa a motilidade espermática do sêmen canino diluído e resfriado, sem alterar a integridade estrutural das membranas plasmáticas e acrossoma.

## 3 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da renovação periódica do meio diluidor sobre a longevidade do sêmen canino diluído e resfriado;
- Avaliar o efeito da conservação do sêmen diluído e resfriado sobre a

motilidade espermática e sobre a integridade estrutural da membrana plasmática e acrossoma;

- Avaliar o efeito imediato da renovação do meio diluidor sobre a motilidade espermática e sobre a integridade estrutural da membrana plasmática e acrossoma, do sêmen canino diluído e resfriado;
- Avaliar o efeito da suplementação periódica do meio diluidor com 4mmol/L de frutose sobre a motilidade espermática, a integridade estrutural da membrana plasmática e acrossoma e a longevidade do sêmen canino diluído e resfriado;
- Avaliar o sêmen canino processado na forma de ejaculados individuais e na forma de pools de sêmen;
- Avaliar parâmetros qualitativos e quantitativos do sêmen canino fresco;
- Avaliar a influência de um curto intervalo de coletas sobre a qualidade do sêmen canino fresco.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 COLETA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN CANINO

A coleta de sêmen é um procedimento rotineiro na clínica reprodutiva de cães e suas indicações incluem: exame andrológico, inseminação artificial, congelamento ou resfriamento do sêmen e suspeita de afecções prostáticas (Johnston et al., 2001; Kutzler 2005). A eleição da técnica de coleta e dos materiais utilizados varia caso-a-caso conforme o perfil do cão e a preferência do profissional. Sêmen canino pode ser coletado pelo método da manipulação digital do pênis (England, 1999; Johnston et al., 2001; Kutzler 2005), que em geral requer condicionamento prévio do cão e/ou presença de uma fêmea em estro. Uma vez que o cão se habitue à coleta por manipulação digital, a presença da fêmea em estro pode ser dispensável (England, 1999; Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005). Nos casos em que a coleta de sêmen por manipulação digital não apresenta sucesso, por exemplo em cães com patologias locomotoras, quadros clínicos dolorosos e ausência de libido, a coleta por eletroejaculação pode ser indicada (Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005). Comparativamente, a coleta por eletroejaculação apresenta algumas desvantagens em relação à manipulação digital, pois é um procedimento que requer anestesia geral, produz grande volume de fluido prostático, levando a piores resultados para criopreservação (Christensen et al., 2011) e resulta em menor número total de espermatozoides no ejaculado, devido ocorrência de ejaculação retrógrada em direção à bexiga (Ohl et al., 1994; Christensen et al., 2011). No entanto, alguns estudos apontam que os parâmetros de motilidade, integridade, viabilidade e morfologia espermática dos espermatozoides coletados por eletroejaculação são semelhantes aos observados em coletas por manipulação digital (Ohl et al., 1994; Christensen et al., 2011), tornando a eletroejaculação uma alternativa viável nos casos em que a coleta por manipulação digital não é possível.

Um contratempo muitas vezes experimentado nos casos de coleta de sêmen para criopreservação, principalmente em se tratando

de raças de pequeno porte, é o baixo número final de doses inseminantes obtidas após a criopreservação. Em alguns casos de coletas para congelamento de sêmen, em função do tamanho do animal, do total de espermatozoides ejaculados, e da queda da viabilidade espermática após o congelamento, o rendimento final chega e ser menor que uma dose inseminante por ejaculado processado. Por este motivo tem-se investigado a possibilidade de efetuar múltiplas coletas de sêmen de um mesmo cão, com intervalos curtos entre si, no intuito de criopreservar, a um só tempo, mais de um ejaculado (England, 1999; Kutzler, 2005). England (1999) avaliou a qualidade do sêmen obtido em dois ejaculados coletados com intervalo de uma hora e verificou que, embora a quantidade de espermatozoides obtidos no segundo ejaculado seja, em média, menor que no primeiro, os parâmetros de motilidade, viabilidade e morfologia espermáticas foram iguais em ambos ejaculados. Verificou, ainda, que a coleta de dois ejaculados com uma hora de intervalo aumenta em 70% a quantidade final de espermatozoides obtidos. O autor não descreve diferença perceptível da libido dos cães entre as coletas. Também, em alguns indivíduos, foi encontrado que tanto o volume do ejaculado, quanto a concentração final de espermatozoides chegou a ser maior no segundo ejaculado.

O estabelecimento de padrões seminais precisos para a avaliação reprodutiva do cão tem se mostrado difícil, em função tanto da grande variabilidade de raças, quanto pela existência de poucos estudos avaliando sistematicamente o ejaculado de um grande número de cães. Em termos qualitativos, consideram-se aceitáveis os ejaculados caninos que apresentem motilidade espermática superior a 70%, com menos de 30% de espermatozoides morfologicamente anormais. Já em termos quantitativos, os parâmetros de concentração espermática, volume do ejaculado, e total de espermatozoides ejaculados podem variar em até 10 vezes em função do tamanho do animal e dos seus testículos (Threlfall, 2003). Embora o tema seja pouco estudado há indícios de que a herdabilidade das características seminais em cães seja de média a baixa, sendo que fatores como idade, estado de saúde e exposição a drogas deletérias à reprodução são os principais implicados na variabilidade individual dos

ejaculados (England et al., 2010). Mesmo assim, observações práticas e alguns trabalhos científicos apontam a existência de características seminais peculiares, específicas de determinados raças (England, 1999; Mascarenhas, 2008; England et al., 2010). Assim, embora em termos qualitativos, os padrões para avaliação seminal no cão sejam razoavelmente estabelecidos, em termos quantitativos a grande amplitude de valores considerados normais, associada à grande variação individual e racial, dificulta uma avaliação objetiva e precisa caso-a-caso.

A eleição de uma técnica, ou na maioria das vezes de um conjunto de técnicas de avaliação do sêmen, depende em grande parte da disponibilidade de tempo, recursos tecnológicos e financeiros. Testes *in vivo*, embora decisivos na determinação da fertilidade do sêmen, demandam muito tempo, recursos financeiros e mão-de-obra, requerem grande número de animais por tratamento avaliado, além de estarem sujeitos a variações outras que não a qualidade do sêmen como: fertilidade individual da fêmea, detecção do momento ótimo de inseminação, método de inseminação, dose e volume inseminante (Eilts, 2005; Rijsselaere et al., 2005).

Métodos laboratoriais de avaliação *in vitro* do sêmen são uma alternativa prática e eficaz, que possibilitam a avaliação simultânea de grande número de amostras, enquanto a associação de mais de um método de avaliação *in vitro* possibilita acessar a integridade e a funcionalidade de diferentes componentes espermáticos, mantendo boa correlação com a fertilidade (Peña Martínez, 2004; Rijsselaere et al., 2005).

Durante décadas a avaliação do sêmen foi realizada por meio de técnicas que envolviam uso de microscópios óticos, corantes e fixadores simples. Parâmetros como motilidade total, motilidade progressiva, concentração, vigor, morfologia e viabilidade espermática eram comumente avaliados por metodologias consagradas, mas que implicam em certo grau de subjetividade e variabilidade (Rijsselaere et al., 2003, Threlfall, 2003).

A motilidade, embora não seja a única, é uma das principais características associadas à fertilidade seminal. Esta é uma manifestação da integridade estrutural e funcional do

espermatozoide, sendo essencial para progressão no trato genital da fêmea e fertilização. A avaliação tradicional da motilidade com auxílio de microscópio ótico é um método rápido e barato, que pode ser facilmente empregado a campo, entretanto subjetivo e sujeito a variações (Peña Martínez, 2004; Rijsselaere et al., 2005). Sistemas de avaliação computadorizada do sêmen (CASAs), possibilitam a rápida e objetiva avaliação de uma grande variedade de parâmetros de movimentação espermática, sendo possível comparar amostras com mais precisão, identificando diferenças sutis que poderiam ser ignoradas por uso de outras metodologias (Rijsselaere et al., 2003; Matos et al., 2008). Diversos parâmetros de movimentação espermática têm sido avaliados pelos métodos computadorizados, entre eles: a motilidade total (MT), percentual de células móveis; motilidade progressiva (MP), percentual de espermatozoides com movimento progressivo; velocidade curvilínea média (VAP), o comprimento geral da trajetória do espermatozoide/tempo; velocidade linear (VSL), comprimento da trajetória considerando-a como uma reta entre o ponto inicial e o final/tempo; velocidade curvilínea (VCL), deslocamento total da célula durante a captura da imagem/tempo; amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimentos flagelares (BCF). Além disso, alguns índices também podem ser construídos com estes parâmetros, como retilinearidade (STR), relação entre espaço percorrido pelo espermatozoide e sua trajetória real ( $VSL/VAP \times 100$ ) e a linearidade (LIN - %), comparação entre trajetos retos e curvilíneos ( $VSL/VCL \times 100$ ) (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001). A motilidade total e progressiva tem sido positivamente correlacionada com outros parâmetros de integridade espermática, como integridade de membrana e normalidade morfológica (Schäfer-Somi e Aurich, 2007). Parâmetros referentes ao padrão de movimentação dos espermatozoides como LIN e VCL têm sido correlacionados com o estado de hiperativação espermática (Rota et al., 1999).

Os primeiros sistemas de avaliação computadorizada do sêmen surgiram ainda na década de 70, mas foi só a partir de 1985 que os CASAs começaram a ser difundidos. Para análise do sêmen canino estão disponíveis

vários CASAs desenvolvidos por diferentes companhias e apresentados em diversas versões (Günzel-Apel et al., 1993; Iguer-Ouada e Verstegen, 2001; Rijsselaere et al., 2002; Chäfer-Somi e Aurich, 2007). Embora a precisão das análises tenha avançado ano a ano com o desenvolvimento dos CASAs, uma nova fonte de variação foi criada pela necessidade de padronização e validação das metodologias de análise e dos parâmetros avaliados. Ajustes técnicos como: frequência de aquisição de imagens; temperatura de análise; concentração espermática; profundidade da câmara de avaliação e presença e tipo de diluidor influenciam de forma significativa os parâmetros avaliados. Além disso, outros aspectos como identificação da espécie, experiência do avaliador e processamento do sêmen também podem influenciar os resultados (Rijsselaere et al., 2003; Matos et al., 2008).

A integridade do acrossoma e membrana plasmática da cabeça são atributos fundamentais para a fertilidade espermática, dado seu papel no processo de reconhecimento e fusão com o ovócito. Diversas técnicas de coloração foram desenvolvidas para avaliar a integridade da membrana plasmática da cabeça e do acrossoma em microscopia ótica. Um grande empecilho à aplicação de algumas destas técnicas na avaliação do sêmen criopreservado é a interferência de componentes do meio diluidor, especialmente a gema de ovo e o glicerol, com a coloração (Peña Martínez, 2004). Como alternativa surgiram técnicas de coloração fluorescentes, que não sofrem interferência do meio. Para avaliação da integridade do acrossoma e membrana plasmática da cabeça de espermatozoides caninos, uma das técnicas mais usadas é a que combina os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP), avaliado em microscopia de epifluorescência (Peña Martínez, 2004; Rijsselaere et al., 2005). O CFDA é um éster que atravessa facilmente as membranas plasmáticas e, ao atingir o citoplasma, é hidrolisado por esterases não específicas transformando-se em um composto (6-CFDA), impermeável à membrana e que emite fluorescência verde. Já o IP é um composto vermelho fluorescente, impermeável à membrana, com grande afinidade por ácidos nucleicos. Quando os espermatozoides apresentam membranas íntegras o CFDA

penetra no citoplasma e acrossoma e é convertido em 6-CFDA, que fica retido, conferindo coloração verde a estes compartimentos. Entretanto, quando há lesão de membrana, há também alteração da permeabilidade de forma que o 6-CFDA deixa o citoplasma e o IP é capaz de atingir o núcleo dos espermatozoides corando-os de vermelho (Harrison e Vockers, 1990).

Outro método simples, barato e eficaz de avaliação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides é Teste Hiposmótico (Jeyendran et al., 1984). Quando os espermatozoides são incubados no meio hiposmótico ocorre difusão de água através da membrana para o citoplasma, na tentativa de equilibrar a osmolaridade do meio intracelular e extracelular. O influxo de água gera um edema de citoplasma e conseqüente enrolamento da cauda. Assim, para que o enrolamento da cauda ocorra é preciso que tanto a estrutura física quanto a funcionalidade da membrana estejam preservados. Em cães o Teste Hiposmótico foi correlacionado positivamente com a motilidade espermática e com o teste de coloração supravital com eosina-nigrosina, enquanto que em humanos com o sucesso de fertilizações *in vitro* (Van der Ven et al., 1986; Kumi-Diaka, 1993; Rodriguez-Gil et al., 1994; Pinto e Kozink, 2007).

#### 4.2 RESFRIAMENTO DE SÊMEN E CHOQUE FRIO

O resfriamento do sêmen provoca, em maior ou menor grau, danos a uma parcela dos espermatozoides no ejaculado. Esses danos, conhecidos como *choque frio*, são decorrentes de alterações na conformação e organização estrutural dos componentes das membranas dos espermatozoide, manifestando-se na forma de queda prematura da motilidade, aumento da permeabilidade da membrana e queda na produção de energia. Quanto maior a velocidade com que o sêmen é resfriado maior a extensão e intensidade dos danos associados ao *choque frio* (Amann e Pickett, 1987).

As membranas dos espermatozoides, como a de todas as células eucariontes, possuem uma estrutura em *mosaico fluído*, que consiste de uma bicamada de lipídeos, formada principalmente por fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol, entremeados de proteínas, que podem

ser integrais ou periféricas. Externamente à membrana podemos ainda encontrar diversos tipos de carboidratos associados a lipídeos e proteínas formando uma cobertura conhecida como glicocalix (Alberts et al., 2002). Os lipídeos componentes das membranas celulares têm função principal de formar uma barreira física, dificultando a passagem de moléculas, especialmente as polares, e dessa forma estabelecendo limites entre o compartimento intra e extracelular. As proteínas por sua vez estão envolvidas em uma grande variedade de funções, entre elas transporte de substâncias, reconhecimento e internalização de sinais bioquímicos (Alberts et al., 2002). Os lipídeos componentes das membranas estão à temperatura ambiente em constante movimentação, tanto lateralmente na própria camada quanto transversalmente de uma camada à outra. Durante o resfriamento dos espermatozoides, essa movimentação diminui e os lipídeos bioquimicamente semelhantes tendem a agrupar-se quando passam do estado líquido para o estado cristalino. Esse agrupamento de lipídeos afins, associado a modificações na sua conformação durante o resfriamento, pode alterar a organização estrutural da membrana, formando áreas de elevada permeabilidade (Valle e Silva Filho, 2001). O aumento da permeabilidade da membrana pode levar à perda de importantes moléculas como ATP, ácidos nucleicos, fosfolipídios, enzimas, além de aumentar a permeabilidade dos espermatozoides a íons e água, desequilibrando a composição iônica do meio intracelular. Ainda, o agrupamento dos lipídeos pode deslocar em conjunto proteínas componentes da membrana, formando domínios com alta concentração proteica. Em alguns casos o deslocamento de proteínas pode interferir diretamente na sua função, como no caso de canais iônicos e receptores de membrana, e em geral a agregação proteica aumenta localmente a permeabilidade da membrana e diminui a função metabólica (Amann e Pickett, 1987; Holt 2000).

A composição lipídica da membrana celular é um dos principais fatores determinantes de sua fluidez. Fosfolipídios com cadeia linear saturada interagem mais fortemente entre si apresentando maior ponto de fusão, já aqueles com cadeias insaturadas assumem a forma líquida a temperaturas mais baixas. Além disso, quanto

maior o grau da insaturação da cadeia linear mais cônica é a conformação do fosfolipídio, e maior a tendência a sofrer alteração na organização estrutural durante o resfriamento. O colesterol na membrana celular posiciona-se entre as cadeias lineares dos fosfolipídios e, dessa forma, pode modificar a interação entre eles influenciando a fluidez da membrana. Durante o resfriamento, o colesterol age estabilizando os fosfolipídios e inibindo seu agrupamento de forma que, membranas com maior concentração de colesterol são mais resistentes a mudanças de temperatura (Watson, 2000).

O espermatozoide canino apresenta em suas membranas baixa proporção de ácidos graxos poli-insaturados, o que explica em parte sua relativa resistência a alterações de temperatura (Bouchard et al., 1990). De fato, ele pode ser resfriado a taxas relativamente altas, de até 0,5°C/min, com bons resultados de motilidade pós-reaquecimento e fertilidade. Entretanto, é importante ter em mente, especialmente em se tratando de espécies com fraca seleção para reprodução, como é o caso do cão, que variações individuais na composição da membrana espermática afetam de forma significativa a resistência do sêmen a processos de criopreservação (Mascarenhas, 2008; Frastad, 2009). Essa variação individual deve ser considerada como um fator que dificulta tanto a padronização de técnicas de criopreservação do sêmen, como a estimativa da fertilidade em casos individuais (Holt, 2000).

Além de agir diretamente sobre a estrutura das membranas espermáticas, o resfriamento de sêmen pode modificar o metabolismo energético e a composição iônica dos espermatozoides levando a alterações semelhantes àquelas observadas durante o processo de capacitação. Dentre estas alterações, presentes em maior ou menor grau no sêmen resfriados, destacam-se o acúmulo intracelular de cálcio, aumento da instabilidade de membranas, maior proporção de motilidade hiperativada e menor tempo de capacitação *in vitro* (Rota et al., 1999; Watson, 2000).

As concentrações intracelulares da maioria dos íons, em especial sódio, potássio e cálcio, diferem das concentrações extracelulares. Esta diferença é mantida em grande parte pelo transporte ativo através da membrana, realizado

por proteínas comumente chamadas de “bombas”, que movem os íons a custas da degradação de ATP. À medida que os espermatozoides são resfriados, a formação de ATP diminui, reduzindo também a eficiência desses transportadores iônicos. Um possível reflexo da queda na eficiência do transporte iônico é a diminuição da atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, com conseqüente acúmulo de sódio e queda das concentrações de potássio no meio intracelular. A alteração na proporção  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pode gerar uma despolarização parcial da membrana, resultando na abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes e seu influxo para o meio intracelular. Além do mecanismo anteriormente descrito, a queda da atividade da própria bomba de cálcio, em função da escassez de ATP ou da transição térmica sofrida pelos lipídeos ao redor do sítio dessa enzima, pode contribuir para o aumento de suas concentrações intracelulares durante o resfriamento (Rota et al., 1999; Watson, 2000).

O acúmulo de cálcio é uma alteração comumente associada ao resfriamento dos espermatozoides, e é também um dos primeiros passos no processo fisiológico de capacitação espermática. Espermatozoides capacitados apresentam maior instabilidade de membranas, são mais sensíveis ao resfriamento e demonstram maior tendência a exibir reação acrossomal espontânea (Flesch e Gadella, 2000). Ainda, durante o resfriamento o acúmulo intracelular de cálcio pode resultar na ativação de fosfolipases citoplasmáticas, resultando em dano direto às membranas tanto citoplasmáticas quanto mitocondriais, potencialmente letais à célula. As alterações associadas a este estado, semelhante à capacitação, reduzem de forma significativa a longevidade espermática, sendo um dos fatores relacionados à menor fertilidade observada com a deposição intravaginal do sêmen criopreservado (Amann e Pickett, 1987; Rota et al., 1999; Watson, 2000).

Outro fator a se considerar durante a criopreservação dos espermatozoides é o efeito da redução da temperatura sobre o citoesqueleto. O citoesqueleto é formado por uma rede de filamentos proteicos que mantém a forma da célula, sua organização intracelular, bem como a capacidade de movimentação (Alberts et al., 2002). Acredita-se também que o citoesqueleto tem importante papel no posicionamento e distribuição das proteínas

integrals da membrana espermática (Flesch e Gadella, 2000). Os componentes do citoesqueleto são termos sensíveis e seu resfriamento pode levar à despolarização das fibras de actina, um dos três tipos de fibras que o compõem. A despolarização do citoesqueleto tem sido investigada como uma das etapas essenciais no processo de reação acrossomal fisiológica, e acredita-se que a despolarização induzida pelo resfriamento pode desestabilizar a estrutura das membranas plasmática e acrossomal, favorecendo sua fusão prematura, o que prejudicaria a fertilidade do sêmen criopreservado (Watson, 2000).

#### 4.3 MEIOS DILUIDORES

Espera-se que o meio diluidor favoreça a conservação do sêmen por pelo menos quatro mecanismos: proteção contra o *choque frio*; suporte metabólico-energético; manutenção do pH; e controle microbiológico. Nas últimas décadas, tem predominado a utilização do meio à base de tampão Tris, ácido cítrico e gema de ovo, inicialmente descrito para conservação do sêmen bovino (Vishwanath e Shannon, 2000).

Embora os espermatozoides caninos apresentem boa longevidade, podendo sobreviver resfriado em plasma seminal por até dois dias, a adição de meios diluidores para o resfriamento de sêmen prolonga a longevidade e melhora a fertilidade das células espermáticas (Rota et al., 1995). Até o momento não existe um consenso sobre o meio diluidor ideal para criopreservação de sêmen canino. O primeiro meio diluidor empregado para resfriamento de sêmen canino foi o leite pasteurizado (Harrop, 1956). Desde então várias tentativas foram feitas com meios diluidores a base de gema de ovo, leite e creme de leite (Rota et al., 1995; England e Ponzio, 1996). A maioria dos pesquisadores trabalha na adequação do meio diluidor a base de tampão Tris, ácido cítrico e gema de ovo, inicialmente descrito para conservação do sêmen bovino (Phillips e Lardy, 1940; Vishwanath e Shannon, 2000). Apesar da variação, os diluidores usados para resfriamento de sêmen canino apresentam em essência composição semelhante, todos utilizam em sua fórmula tampões, macromoléculas proteicas e açúcares.

#### 4.3.1 Macromoléculas Proteicas e o Choque Frio

As macromoléculas proteicas, em especial as lipoproteínas, são sabidamente importantes para a preservação da integridade das membranas espermáticas. Estas interagem diretamente com as membranas e/ou com proteínas do plasma seminal favorecendo a manutenção da estabilidade e integridade das membranas, de forma que sua presença no meio diluidor é vital para sobrevivência dos espermatozoides caninos durante o resfriamento e armazenamento em geladeira (Pace e Grahman, 1974; Bergeron e Manjunath, 2006). A gema de ovo é uma das primeiras fontes de macromoléculas proteicas, e até hoje a mais utilizada em meios diluidores de sêmen. Um dos primeiros relatos da utilização de gema de ovo na criopreservação de sêmen vem de Phillips e Lardy (1940). Em seu experimento, testaram diversas substâncias, entre elas algumas pouco usuais como macerado de cérebro de galinha e extrato de músculo, e concluíram que a mistura de gema de ovo e tampão fosfato fornecia as condições físicas e metabólicas mais favoráveis à preservação dos espermatozoides. A gema de ovo é amplamente utilizada em meios de preservação espermática em todas as espécies domésticas (Pace e Grahman, 1974; Cookson et al., 1984). Pace e Graham (1974) identificaram as lipoproteínas de baixa densidade, as LDLs (*Low Density Lipoproteins*) como as principais moléculas responsáveis pelo efeito crioprotetor da gema de ovo. Desde então, vários estudos vêm investigando seu papel na proteção espermática durante o resfriamento e o congelamento. Três hipóteses principais foram formuladas para explicar o mecanismo crioprotetor das LDLs. A primeira delas sugere que as LDLs protegem os espermatozoides estabilizando fisicamente a membrana por meio da formação um filme protetor na interface entre os ácidos graxos e a água. Entretanto, os dados que evidenciam a estabilidade da associação entre as LDLs e a membrana são contraditórios e têm sido contestados. A segunda hipótese sugere que as LDLs protegem os espermatozoides por meio da reposição de fosfolipídios perdidos ou danificados durante a criopreservação. No entanto, há falta de evidências concretas de que lipídeos componentes das LDLs são incorporados à membrana espermática. A terceira e mais plausível hipótese sugere que a

crioproteção associada às LDLs advém de sua interação com proteínas do plasma seminal (Bergeron e Manjunath, 2006). Manjunath et al. (2002) identificaram uma família de proteínas no plasma seminal de touros, as BSPs (*Bull Sperm Proteins*), que se ligam a membrana dos espermatozoides promovendo efluxo de colesterol e fosfolipídios. Também no plasma seminal canino proteínas semelhantes às BSP foram identificadas (Souza et al., 2007). O efluxo de colesterol tem sua função fisiológica, auxiliando no processo de capacitação espermática e possibilitando a fertilização. Entretanto, no que diz respeito à criopreservação, o efluxo de colesterol e a consequente desestabilização das membranas são altamente deletérios, diminuindo a longevidade espermática e a fertilidade do sêmen criopreservado. As LDLs ligam-se, com alta afinidade, às BSPs, impedindo sua interação com a membrana e desta forma favorecendo a sobrevivência dos espermatozoides durante o resfriamento e mesmo o congelamento (Bergeron e Manjunath, 2006). Como o efluxo de colesterol e fosfolipídios é proporcional ao tempo de exposição às BSPs e à sua concentração no ejaculado, a interação entre LDLs e BSPs é especialmente importante para na conservação do sêmen canino resfriado uma vez que os espermatozoides podem ficar expostos a altas concentrações de BSPs por períodos prolongados.

#### 4.3.2 Açúcares e Metabolismo Energético

Apesar de o plasma seminal canino não conter quantidades significativas de açúcares como glicose, frutose, sorbitol ou manose, os espermatozoides dependem de fontes exógenas de energia para manter seu metabolismo quando preservados *in vitro*, uma vez que praticamente todas as reações que mantem o status funcional das células, bem como aquelas relacionadas à sua resistência a exposição a ambientes e temperaturas não-fisiológicos demandam consumo de energia (Rigau et al., 2002; Rodriguez-Gil, 2006). Assim a suplementação de açúcares no meio diluidor, é fundamental para a manutenção da motilidade e integridade no sêmen criopreservado (Ponglowhapan et al., 2004). É sabido que a principal via metabólica do espermatozoide é a glicolítica embora, contraditoriamente, a energia obtida pelo ciclo de Krebs seja essencial para a manutenção da

motilidade espermática (Rigau et al., 2002; Rodriguez-Gil, 2006). No entanto, o metabolismo energético dos espermatozoides, e em especial o espermatozoide canino, parece ser bem mais complexo do que o inicialmente imaginado. A metabolização dos açúcares e obtenção de energia envolve um complexo de vias metabólicas cuja correlação, ativação, regulação e função apenas se começa a vislumbrar.

Um dos primeiros passos moduladores do metabolismo energético em todas as células é o transporte dos carboidratos através da membrana (Alberts, 2002). Na maioria das espécies, o transporte de hexoses nos espermatozoides é feito por proteínas da família dos Transportadores de Glucose (GLUT). Nos espermatozoides mamíferos foram identificados 5 proteínas da família GLUT, cada uma com características próprias de velocidade de transporte e afinidade por substratos. Proteínas GLUT-1 e GLUT-2 apresentam fraca afinidade por glicose e glicose e frutose, respectivamente; já proteínas GLUT-3 e GLUT-5 que possuem alta afinidade por glicose e frutose, respectivamente; as GLUT-4 por sua vez apresentam um caráter insulina-dependente. É interessante notar que foram observadas diferenças espécies-específicas tanto na expressão quanto na localização destas proteínas. No espermatozoide canino, entretanto, um dos principais sistemas transportadores de hexoses são as proteínas da família dos Co-transportadores de Glicose Sódio-dependentes (SGLT). Ao contrário do observado para a família GLUT, as SGLT são transportadores generalistas, associadas ao transporte de uma grande variedade de moléculas de baixo peso, e ao direcionamento do metabolismo de açúcares, não para a geração imediata de energia, mas para síntese de glicoproteínas componentes da membrana celular (Rodriguez-Gil, 2006).

O segundo importante passo regulador do metabolismo das hexoses é sua conversão em Gliocose-6-Fosfato, processo controlado por proteínas da família das hexoquinases. Nos espermatozoides da maioria das espécies domésticas, até o momento, foi identificada apenas uma proteína desta família, a hexoquinase tipo 1, que possui alta afinidade pela glicose e baixa afinidade por outras hexoses, como a frutose. A presença nos

espermatozoides de apenas uma hexoquinase, com altíssima afinidade por glicose, aparentemente limita a utilização de outros açúcares em diferentes vias metabólicas. Esta estratégia parece ser característica de células com baixa expectativa de vida, nas quais o metabolismo energético predominante é o catabólico (Rodriguez-Gil, 2006). Já o espermatozoide canino apresenta, além da hexoquinase tipo 1, uma segunda hexoquinase semelhante à glicoquinase. Em outros vertebrados, as glicoquinases, ou hexoquinases tipo 4, são um membro da família das hexoquinases com características bastante peculiares. As glicoquinases não possuem um substrato específico, podendo fosforilar uma grande variedade de hexoses, entre elas a glicose, frutose e manose. A alta afinidade por glicose associada a um controle preciso da sua expressão faz das glucoquinases um mecanismo sensível e eficiente de controle do metabolismo de glicose nas células de mamíferos (Fernandez-Novell et al., 2004). Ainda, as glicoquinases presente no fígado e pâncreas agem como moduladores, direcionando o metabolismo de hexoses ora para vias metabólicas ora para vias anabólicas, segundo o status fisiológico das células e principalmente a concentração extracelular de açúcares (Rodriguez-Gil, 2006).

Em espécies como o cão, em que os espermatozoides precisam sobreviver no trato genital da fêmea por longos períodos, a eficiência metabólica e a sobrevivência celular poderiam ser otimizadas se parte dos açúcares fossem desviados para vias anabólicas, formando reservas intracelulares de energia. Ao contrario do observado para as demais espécies, o espermatozoide canino parece capaz de sintetizar glicose a partir de substratos exógenos com três carbonos como o lactato, ou mesmo hexoses como a frutose (Rigau et al., 2002; Albarracín et al., 2004). Boa parte da glicose recém-sintetizada, bem como da glicose exógena parece ser armazenada na forma de glicogênio, de forma que o espermatozoide canino, o que apresenta a maior taxa de formação e acúmulo de glicogênio entre os mamíferos (Albarracín et al., 2004; Rodriguez-Gil, 2006). A incubação de espermatozoides caninos em meios sem adição de açúcar provoca uma diminuição progressiva do conteúdo intracelular de glicogênio. A adição de açúcares, especialmente a frutose, ao meio diluidor age de

forma dose-dependente, não só diminuindo a taxa de queda da concentração intracelular de glicogênio como também repondo o glicogênio consumido (Rigau et al., 2002). Rigau et al. (2002) demonstraram que quando incubados em meio contendo 10mmol/L de frutose os espermatozoides caninos são capazes de atingir, em 15 minutos, concentrações de glicogênio intracelulares superiores ao observado no momento da ejaculação.

O espermatozoide canino utiliza de forma eficiente tanto a glicose quanto a frutose como fonte de energia, sendo estes os açúcares mais comuns nos meios diluidores para resfriamento e congelamento de sêmen (Yildiz et al., 2000; Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005; Rodriguez-Gil, 2006). A incubação de espermatozoides caninos em meios sem a adição de açúcares provoca perda progressiva da motilidade e linearidade de movimentação. A adição de frutose ou glicose previne a queda da motilidade e linearidade, de uma forma dose-dependente, perceptível a concentrações tão baixas quanto 1mmol/L (Rigau et al., 2001). Rigau et al. (2002) avaliaram o efeito da adição de glicose e frutose ao meio diluidor para preservação do sêmen canino à temperatura ambiente e verificaram que a glicose é capaz de incrementar o metabolismo espermático de forma mais eficiente que a frutose. Esse incremento metabólico, dose-dependente, foi confirmado não só pelo aumento do conteúdo intracelular de ATP, mas também pelo aumento da concentração de metabólitos intermediários de glicólise, aumento da taxa de produção de lactato e CO<sub>2</sub> e da deposição de glicogênio. A suplementação com frutose, em comparação com a glicose, parece aumentar a taxa de consumo de ATP por dois mecanismos: por um lado a suplementação com frutose resulta em um padrão de motilidade espermática mais rápida e linear (Rigau et al., 2001) que também demanda mais energia e por outro ela aumenta de forma marcante a fotorilação das exosses. Já Ponglowhapan et al. (2004) avaliaram o efeito da suplementação de glicose e frutose no meio diluidor para resfriamento de sêmen canino e verificaram que, em meios contendo concentrações iguais de ambos açúcares o consumo de glicose foi superior ao de frutose. No entanto, meios contendo apenas frutose proporcionaram melhor manutenção da motilidade do que aqueles contendo apenas

glicose ou a mistura de ambas. Yldiz et al. (2000), avaliando o efeito da suplementação de monossacarídeos (frutose, galactose, glicose e xilose), dissacarídeos (lactato, trealose, maltose e sucrose) e um trissacarídeo (rafinose) no meio para congelamento de sêmen canino demonstraram que meios diluidores contendo diferentes açúcares proporcionam crioproteção semelhante às células espermáticas. Ainda, Chirinéa et al. (2003), avaliando o efeito da suplementação de glicose, lactose, sacarose e rafinose no meio diluidor para congelamento de sêmen não encontraram diferenças na motilidade espermática e integridade de membranas pós-descongelamento entre os tratamentos. Assim, embora aparentemente frutose e glicose sejam as fontes energéticas preferencialmente utilizadas pelos espermatozoides caninos, meios contendo diferentes açúcares parecem ser capazes de manter a motilidade e viabilidade espermática durante a criopreservação (Yldiz et al., 2000; Rigau et al., 2001; Rigau et al., 2002; Chirinéa et al., 2003; Ponglowhapan et al., 2004).

A motilidade espermática pode ser mantida em meios com baixas concentrações de açúcares; entretanto, meios diluidores contendo altas concentrações proporcionam melhor motilidade durante a conservação do sêmen resfriado por longos períodos (Ponglowhapan et al., 2004). Ponglowhapan et al. (2004) estudando o efeito da suplementação de glicose e frutose no meio diluidor para resfriamento de sêmen canino verificaram que sêmen diluído em meios contendo maior concentração de açúcares (70mM x 10mM) apresentavam melhor motilidade durante a conservação em geladeira. Já Rigau et al. (2002) avaliando o efeito da adição de glicose e frutose ao meio diluidor para preservação do sêmen à temperatura ambiente verificaram que suplementação de açúcares em concentrações variando de 1 a 10mmol/L teve efeito benéfico na manutenção da motilidade, viabilidade espermática e integridade acrossomal do sêmen enquanto concentrações superiores a 10mmol/L tiveram efeitos deletérios.

Rodriguez-Gil (2006), estudando o metabolismo energético dos espermatozoides durante o resfriamento, argumenta que a célula espermática da maioria dos mamíferos não é fisiologicamente preparada para sobreviver por longos períodos, mas que a fisiologia

espermática de cada espécie é adaptada à sua estratégia reprodutiva. Neste sentido, o cão é uma espécie com estratégia e fisiologia reprodutivas peculiares, apresentando sistema promíscuo de acasalamento, associado a um longo período de receptividade sexual (em média 7 dias), e viabilidade ovocitária (até 3 dias) (Feldman e Nelson, 2004). Em populações de vida livre, durante o longo estro, espermatozoides de diferentes machos aparentemente competem entre si, dentro do trato genital da fêmea pela fertilização dos ovócitos. O metabolismo energético dos espermatozoides caninos parece ser complexo e sofisticado, com capacidade de metabolizar uma grande variedade de carboidrato, por diferentes vias metabólicas, catabólicas e anabólicas, cuja ativação e controle ainda não são bem compreendidos (Albarracín et al., 2004; Rodriguez-Gil, 2006; Bucci et al., 2010). É possível que, ao longo da evolução da espécie, cães cujos espermatozoides permanecessem viáveis no trato genital da fêmea por mais tempo tenham atingido melhor sucesso reprodutivo, selecionando assim as características que hoje se refletem no metabolismo energético e longevidade espermáticas peculiares, característicos do cão.

#### 4.3.3 pH

A presença de pH adequado tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular é essencial para manutenção da vitalidade das células. Variações acentuadas no pH do sêmen diluído podem alterar a conformação de proteínas, influenciar a estabilidade das membranas e interferir nas mais diversas funções como transporte iônico, produção de energia, reconhecimento de moléculas e manutenção da motilidade. Uma das alterações observadas durante a preservação do sêmen por longos períodos é a queda do pH do meio, associada à queda da motilidade e da fertilidade (Norman et al., 1948; Vishwanath e Shannon, 2000; Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005). Quanto maior o tempo e a temperatura de armazenamento, mais marcantes são a alteração do pH do meio e da motilidade e viabilidade espermáticas (Norman et al., 1958; Vishwanath e Shannon, 2000; Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005). Norman et al. (1958) estudando a preservação do sêmen bovino a temperatura ambiente observaram

diminuição na motilidade espermática, no consumo de oxigênio e possivelmente no metabolismo geral associado à acidificação do meio. Este efeito foi revertido com a renovação do meio diluidor, e consequente restabelecimento do pH fisiológico, após 150 horas de armazenamento. Com base nestes achados, passou-se a investigar a imobilização através da diminuição do pH do meio como forma de aumentar a longevidade dos espermatozoides. Bartlett e Van Demark (1962), utilizando gás carbônico dissolvido como acidificante no meio para conservação do sêmen bovino a temperatura ambiente, relatam que foi possível manter a motilidade dos espermatozoides, acima de 45% por períodos superiores a 90 dias. Os autores observaram que, embora a motilidade tenha sido mantida por longo período, a fertilidade decaiu de forma acentuada a partir do segundo dia de armazenamento. Já Shahiduzzaman e Linde-Forsberg (2007) verificaram que a indução da imobilidade não alterou o consumo de glicose, nem a motilidade ou a integridade das membranas plasmáticas e acrossomal do sêmen canino resfriado por 23 dias. Vestegen et al. (2005) descreveram queda do pH durante o armazenamento do sêmen a 4°C de 6,8 no Dia 1 para 6,6 no Dia 13 e os autores ressaltam que a queda do pH foi acompanhada em paralelo pela queda da motilidade espermática.

#### 4.3.4 Antioxidantes e Lipoproteínas

*Espécies de oxigênio reativo* (ROS) são uma classe de moléculas que engloba radicais livres, compostos não-radicaais, e derivados do oxigênio, todos com alto poder de oxidar outras moléculas. Em concentrações fisiológicas os ROS agem como sinais mediadores em uma grande variedade de processos celulares, influenciando pontos cruciais da reprodução como capacitação espermática, reação acrossomal, implantação e desenvolvimento embrionário inicial (Bansal e Bilaspuri, 2011). No ejaculado, as ROS são normalmente produzidas por espermatozoides e leucócitos e embora a produção de ROS seja um processo fisiológico, o desequilíbrio entre sua produção e degradação é deletério para as células espermáticas e associado à infertilidade no macho. As ROS podem danificar diretamente todos os componentes celulares, no entanto os lipídeos componentes das membranas parecem

ser o principal sítio de ação nos espermatozoides (Michael et al., 2009; Bansal e Bilaspuri, 2011). O sêmen canino contém, tanto no plasma quanto no próprio espermatozoide, diversos sistemas antioxidantes, entre eles a superóxido desmutase, glutatión peroxidase e o ácido ascórbico (Strzezek et al., 2009). A criopreservação do sêmen por si é associada à geração de radicais livres, a isso se soma a perda de viabilidade e degradação de uma parcela dos espermatozoides, de forma que o estresse oxidativo é um importante fator associado a queda da fertilidade no sêmen criopreservado (Bansal e Bilaspuri, 2011). Vários estudos têm avaliado a suplementação com antioxidantes, seja por via oral seja no meio diluidor de sêmen, no intuito de diminuir o estresse oxidativo e aumentar a longevidade e fertilidade do sêmen canino resfriado. Michael et al. (2009) avaliaram o efeito da adição de vitamina C, N-aceticiteína, taurina, catalase, vitaminas E e B16 ao meio diluidor Tris-Gema para resfriamento de sêmen. Os autores verificaram efeito benéfico da adição de catalase, vitaminas E, B16 e taurina sobre a motilidade espermática, embora apenas a vitaminas E e B16 tenham melhorado a viabilidade espermática e só a B16 demonstrou efeito sobre a integridade de membranas espermáticas. Rocha et al. (2009) avaliaram o efeito da suplementação oral com vitamina E, associada a ácidos graxos poli-insaturados omega 3, 6 e 9 sobre a qualidade do sêmen canino fresco e verificaram incremento no volume ejaculado, vigor e concentração espermáticos, bem como aumento da porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais após 60 dias de suplementação. Já Beccaglia et al. (2009) avaliando o efeito da adição de catalase ao meio diluidor Tris-Gema para resfriamento de sêmen canino, relatam que não houve variação na qualidade do sêmen durante os 4 dias de avaliação. Entretanto, Strzezek et al. (2009) pesquisando a presença de antioxidantes no sêmen canino não foi capaz de detectar níveis significativos de catalase em nenhuma das frações do ejaculado.

O feito crioprotetor da gema de ovo, mais especificamente de suas lipoproteínas, sobre os espermatozoides de diversas espécies é bem conhecido. A maioria dos meios de criopreservação de sêmen de cão conta com este

ingrediente em sua fórmula. Entretanto, a gema de ovo é um produto biológico complexo e desta forma sujeito a variações em sua composição. Por ser um bioproduto de origem animal a comercialização internacional de sêmen diluído em meios contendo gema de ovo pode ser restrita por barreiras sanitárias uma vez que acarreta risco potencial de contaminação microbiológica (Bousseau et al., 1998).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram primeiramente isoladas por Mayer e Lasley em 1945, e desde então tem sido utilizadas na criopreservação de sêmen bovino (Amirat et al., 2004), equino (Canisso et al., 2008), suíno (Zhong-liang et al., 2007) ovino (Moustacas et al., 2011) e canino (Varela Júnior, 2009). Bencharif et al. (2008) avaliaram a possibilidade de substituição da gema de ovo por LDL para congelamento de sêmen canino e verificaram que os meios contendo LDL proporcionaram motilidade semelhante aos meios contendo gema de ovo, com melhor preservação da integridade de acrossoma, membrana plasmática e DNA. Os autores obtiveram ainda 100% de taxa de prenhez (n=6) com sêmen congelado em meio à base de LDL. Mais tarde Varela Júnior (2009) demonstrou com sucesso a possibilidade de substituição da gema de ovo por lipoproteínas de baixa densidade não só para o congelamento, mas também para resfriamento de sêmen canino. Embora a LDL ofereça a vantagem de ser um bioproduto de composição controlada e previsível, ela ainda é um produto de origem animal, sujeito a riscos sanitários potenciais. A lecitina de soja, um composto rico em fosfolipídios, mais especificamente fosfatidilcolina, tem surgido como uma alternativa à gema de ovo e à LDL para composição de meios diluidores de sêmen. Os mecanismos de crioproteção da lecitina de soja ainda não são completamente esclarecidos mas, em função da semelhança bioquímica, acredita-se que estes sejam próximos aos descritos para a LDL (Zhang et al., 2009). Beccaglia et al. (2009) avaliaram o efeito da substituição da gema de ovo por lecitina de soja sobre a motilidade e potencial fertilizante de espermatozoides caninos resfriados por 4 dias. Os autores concluíram que a lecitina de soja é um substituto adequado para a gema de ovo, uma vez sêmen resfriado em meios à base de lecitina e gema de ovo apresentaram semelhante

motilidade, grau de capacitação espermática e capacidade de se ligar à zona pelúcida de ovócitos caninos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado após aprovação do projeto pelo CETEA/UFMG sob o número 009/2012

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados seis cães, dois da raça Labrador e dois da raça Shar Pei, com idades entre três e cinco anos, provenientes de canil particular. Os animais foram alojados em canis individuais de 6 m<sup>2</sup>, compostos de área coberta com abrigo e solário, sendo alimentados com ração comercial oferecida duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Foram selecionados para o experimento cães que apresentavam motilidade espermática acima de 70% e menos de 30% de espermatozoides morfológicamente anormais no ejaculado (Johnson et al., 2001).

### 5.2 COLETA DE SÊMEN

Antes do início do experimento os cães tiveram sua reserva espermática extra-gonadal esgotada. Para tanto, foram realizadas cinco coletas de sêmen sucessivas, com intervalo de 2 horas entre as coletas, em cada animal. As coletas destinadas ao resfriamento tiveram início três dias após (England, 1999). Para todos os experimentos, a segunda fração do ejaculado, identificada pela coloração esbranquiçada, foi coletada pelo método de manipulação digital do pênis (Linde-Forsberg, 2001), com auxílio de saco plástico acoplado a um tubo tipo *falcon*.

No Experimento 1, abordou-se o efeito da renovação do meio diluidor sobre a qualidade do sêmen resfriado, com o sêmen avaliado a partir de ejaculados individuais. No Experimento 2 comparou-se os resultados obtidos a partir de ejaculados individuais e de *pools* de sêmen, submetidos às mesmas condições experimentais. No Experimento 3, avaliou-se o efeito da suplementação com frutose sobre a qualidade do sêmen canino resfriado, somente com *pools* de sêmen. Para avaliação dos ejaculados individuais, foi coletado um ejaculado de cada indivíduo, os quais foram esfriados e processados

individualmente, sendo todas as coletas realizadas no mesmo dia. Para a formação de *pools*, sêmen dos mesmos cães foi coletado no mesmo dia, avaliado quanto à qualidade a fresco, centrifugado e diluído individualmente (para maiores detalhes vide seção 5.3), e em seguida os ejaculados foram agrupados na forma de *pools* para o resfriamento e processamento de acordo com os tratamentos experimentais. Os *pools* foram obtidos com intervalo de 2 a 3 dias entre si.

Nos resultados complementares, abordou-se a qualidade do sêmen canino fresco, realizando-se, para cada cão, quatro coletas de sêmen semanais, duas às segundas-feiras e duas às quintas-feiras, durante o período de um mês, totalizando 84 coletas. As coletas realizadas no mesmo dia tiveram intervalo de aproximadamente três horas entre si.

### 5.3 PROCESSAMENTO DO SÊMEN

O sêmen coletado foi imediatamente avaliado quanto a características macroscópicas, vigor, motilidade e concentração espermática (para detalhamento vide seção 5.4). Após a avaliação inicial, o sêmen foi diluído, na proporção de 1:1 em meio Tris-Gema (Rota et al., 1995) previamente aquecido a 37°C, e centrifugado a 500g/10min. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado ressuspendido em meio Tris-Gema até concentração final de 50x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. O sêmen foi então resfriado em caixa de resfriamento desenvolvida para o experimento. A caixa de resfriamento desenvolvida consiste de uma caixa de poliestireno retangular, (medidas externas: 22,5 cm de comprimento x 18,5 cm de altura e 13,5cm de largura, com paredes de 1,5cm de espessura), preenchida com um gelo reutilizável retangular (5cm de comprimento x 14,5 cm de altura x 9 cm de largura), três placas de poliestireno também retangulares (duas placas medindo 2,5cm de comprimento x 12,5 cm de altura x 10 cm de largura, e uma medindo 4cm de comprimento x 12,5 de altura x 10 cm de largura), e uma garrafa plástica cilíndrica com tampa, hermeticamente fechada, (5cm de diâmetro x 13cm de altura), contendo o tubo tipo *falcon* com tampa com o sêmen diluído (Figs. 1 e 2). No tempo 0 do resfriamento, os componentes da caixa foram organizados de

forma que as 3 placas de poliestireno ficassem entre o gelo reutilizável e a garrafa plástica contendo o sêmen. Aos 40 minutos de resfriamento, as placas de poliestireno foram movidas de forma a manter apenas 1 placa fina entre o gelo reutilizável e a garrafa plástica, e em seguida, aos 70 minutos de congelamento a garrafa plástica foi posta em contato direto com o gelo reutilizável (Fig. 3).



Figura 1 - Caixa de resfriamento de sêmen.

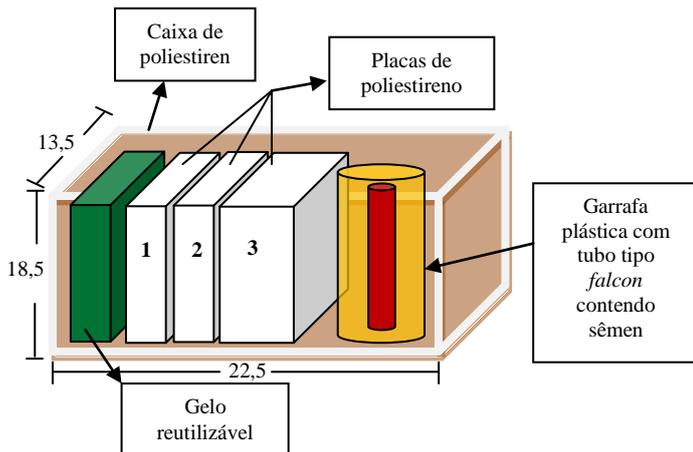


Figura 2 - Disposição dos componentes da caixa de resfriamento de sêmen, no tempo 0. Medidas em centímetros.

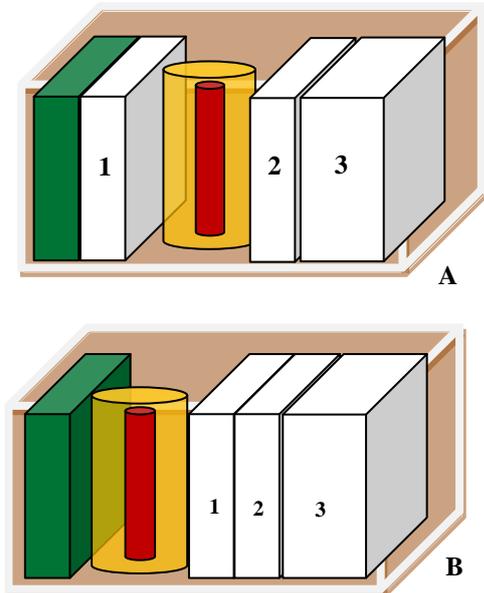


Figura 3 - Disposição dos componentes da caixa de resfriamento de sêmen, aos 40min. (A), e aos 70min. (B).

Para determinar a taxa de resfriamento obtida com uso da caixa, antes do início do experimento a queda da temperatura do sêmen durante o resfriamento foi mensurada em 4 caixas, com auxílio de termômetro posicionado dentro do tubo tipo *falcon*. A taxa de resfriamento média foi de 0,26 C°/min, entre 37 e 16 C°, e 0,08 C°/min, entre 16 a 8 C° (Fig. 4). A temperatura final atingida foi de 7 C°, aos 240 min. Temperatura - C° esta se manteve por 6 horas.

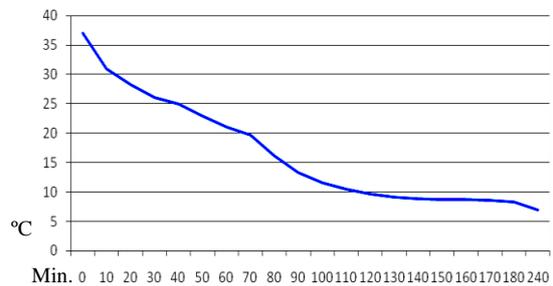


Figura 4 - Média da queda da temperatura do sêmen durante resfriamento em caixa de poliestireno.

Após resfriado o sêmen foi mantido em geladeira a 5 °C por 14 dias. Durante a conservação em geladeira, cada ejaculado, ou cada *pool* de sêmen foi dividido em dois, sendo cada metade destinada a um dos seguintes tratamentos:

- Experimento 1 e 2:

Tratamento 1: o meio diluidor foi renovado a cada seis dias.

Tratamento 2: o meio diluidor foi renovado, uma única vez, aos doze dias.

- Experimento 3:

Tratamento 1: o meio foi suplementado com 4mmol/L de frutose a cada seis dias.

Tratamento 2: o meio diluidor foi suplementado com 4mmol/L de frutose, uma única vez, após 12 dias.

Para a renovação do meio, igual volume de meio recém-preparado, acondicionado em tubo tipo *falcon*, foi resfriado em geladeira por 2 horas. Em seguida, o sêmen diluído foi centrifugado em centrífuga refrigerada (5°C), a 500 g por 10min. O sobrenadante foi

desprezado, e o *pellet* ressuspenso em meio recém preparado ou no meio diluidor original conforme a tratamento experimental.

Para suplementação com frutose, considerando que o peso molar (peso de um mol) da frutose é 180g, foi feita uma solução estoque de frutose com concentração de 400 mmol/L (7,2g de frutose dissolvidos em 100mL de água destilada), que foi resfriada a 5 °C. Adicionou-se, para cada mL de meio diluidor, 10µL da solução estoque de frutose de forma a aumentar a concentração de frutose no meio em 4mmol/L.

## 5.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Volume do ejaculado, concentração espermática por mL de sêmen, concentração total de espermatozoides no ejaculado e avaliação subjetiva da motilidade e vigor espermáticos foram avaliados, para todos os ejaculados, no momento da coleta do sêmen.

As avaliações de motilidade por análise computadorizada e integridade de membranas plasmáticas e acrossoma foram realizadas, ao término da curva de resfriamento (Dia 0), a cada 48 horas, durante os 14 dias de conservação em geladeira, e imediatamente antes e após a renovação do meio diluidor.

### 5.4.1 Volume do ejaculado, concentração espermática por mL de sêmen, concentração total de espermatozoides no ejaculado

Procurou-se coletar apenas a segunda fração do ejaculado, a fração espermática, cujo volume foi mensurado por meio da graduação do tubo coletor tipo *falcon*. A concentração de espermatozoides por mL de sêmen, na fração espermática, foi determinada pela diluição do sêmen em solução de formol-salina tamponada na taxa de 1:100 e posterior contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer sob microscopia de luz em aumento de 400X. (Hafez e Hafez, 2004). A concentração total de espermatozoides no ejaculado foi obtida multiplicando-se a concentração de espermatozoides por mL de sêmen pelo volume da segunda fração do ejaculado.

### 5.4.2 Motilidade Espermática

A avaliação subjetiva da motilidade e vigor espermáticos foi realizada com auxílio de microscópio de luz, em aumento de 200 e 400x, utilizando 10µl de sêmen fresco preparados entre lamina e lamínula previamente aquecidos a 37°C. Dois observadores avaliaram as amostras quanto à motilidade, expressas em porcentagem (0-100) e vigor espermático, expresso numa escala de 0 (imobilidade) a 5 (mobilidade rápida) (Hafez e Hafez, 2004).

Para avaliação da motilidade espermática do sêmen resfriado foi utilizado o Sperm Class Analyser® (SCA) versão 4.0 da ©Microptic (Barcelona, Espanha). As amostras resfriadas foram aquecidas em banho-maria a 37°C por 2min e em seguida uma gota de 5µL foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C e acondicionada ao SCA. O *setup* foi ajustado para os padrões de movimentação do sêmen de canino pré-existent. Foram observados um mínimo de 3 campos e 500 espermatozoides, com frequência de aquisição de imagens de 25 imagens/s. Posteriormente, a classificação dos espermatozoides em todas as imagens foi revisada manualmente, para corrigir eventuais erros provocado por partículas suspensas no meio ou pela interferência de um espermatozoide na movimentação ou estação de outro. Os espermatozoides foram classificados nas seguintes categorias:

- Móveis Rápidos Progressivos: aqueles com velocidade curvilínea (VCL) maior que 100 micron/s e retilinearidade (STR) maior que 75;
- Móveis Lentos Progressivos: aqueles com VCL entre 65 e 100 micron/s e STR maior que 75;
- Móveis Não Progressivos: aqueles com VCL maior que 10 micron/s e STR menor que 75;
- Imóveis: aqueles com VCL menor que 10 micron/s.

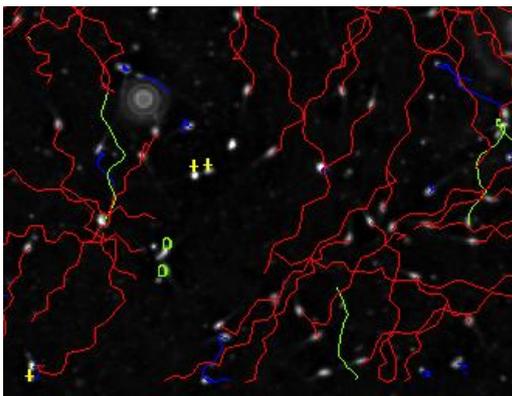


Figura 5 - Foto da avaliação da motilidade espermática realizada utilizando o Sperm Class Analyser® (SCA) evidenciando os espermatozoides móveis rápidos progressivos (vermelho), móveis lentos progressivos (verde), movei não progressivos (azul) e imóveis (amarelo).

Foi avaliada também a retilinearidade (STR), relação entre espaço percorrido pelo espermatozoide e sua trajetória real e a linearidade (LIN) comparação entre trajetos retos e curvilíneos, ambos expressos em escala de 0-100.

#### 5.4.3 Integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides

A integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides foi avaliada pelo Teste Hiposmótico (HO) de acordo com a técnica descrita por Kumi-Diaka (1993). Para tanto uma alíquota de 50µL de sêmen é adicionada a 500µL de solução de 60mOsm/L de frutose em água destilada, incubada por 30 minutos em banho-maria a 37°C e fixada em 250µL de formol salina tamponada. As células fixadas foram observadas ao microscópio ótico, com 400x de aumento, e classificadas quanto à presença de enrolamento da cauda. Para determinação da porcentagem de células com cauda enrolada antes da incubação em solução hiposmótica, uma alíquota de 50µL de sêmen foi fixada em 250µL de formol salina tamponada para observação em microscópio ótico. A porcentagem de células com membrana íntegra

(HO) foi calculada segundo a fórmula proposta por Melo e Henry (1999):

$$HO = \left[ \begin{array}{c} \% \text{ de} \\ \text{espermatozoides} \\ \text{com cauda} \\ \text{enrolada após} \\ \text{incubação em} \\ \text{meio hiposmótico} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{c} \% \text{ de} \\ \text{espermatozoides} \\ \text{com cauda} \\ \text{enrolada antes da} \\ \text{incubação em} \\ \text{meio hiposmótico} \end{array} \right]$$

#### 5.4.4 Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça e acrossoma

A integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça e do acrossoma dos espermatozoides resfriados foi avaliada pela técnica da fluorescência, adotando-se dois fluorocromos: o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP), segundo o protocolo proposto por Harrison e Vickers (1990) modificado por Zúccari (1998). Para tanto foi adicionado aos 40µL da solução trabalho 10µL de sêmen, sendo a solução final incubada por 8 minutos em banho-maria a 37°C. Os espermatozoides foram então avaliados, em microscópio de epifluorescência, no aumento de 400X, ao abrigo da luz, utilizando filtro de 480 a 610nm. Foram avaliados 200 espermatozoides, considerando-se três categorias:

- Íntegros (completamente marcados pelo CFDA);
- Lesados (completamente marcados pelo PI);
- Semi-lesados (marcados tanto pelo CFDA quanto pelo PI).

#### 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com parcelas subdivididas, sendo o animal ou o *pool* de sêmen o bloco, o tratamento a parcela e o dia a subparcela. As variáveis apresentaram distribuição normal, e foram comparadas pela ANOVA utilizando o teste Tukey-Kramer com nível de significância de 5%, no programa SAS versão 2008. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão.

## 6 EXPERIMENTO 1: RENOVAÇÃO DO DILUIDOR NA QUALIDADE DO SÊMEN CANINO RESFRIADO

### 6.1 RESUMO

Avaliou-se o efeito da renovação do meio diluidor sobre a qualidade dos espermatozoides caninos resfriados. Sêmen de seis cães foi coletado, diluído, na proporção de 1:1 em meio Tris-Gema, centrifugado a 500g/10min, e o *pellet* ressuspenso até concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O sêmen foi resfriado a 0,26 °C /min, entre 37 e 16 °C, e 0,08 °C /min, entre 16 a 8 °C e mantido em geladeira a 5 °C por 14 dias. No Tratamento 1 o meio diluidor foi renovado a cada seis dias e no Tratamento 2 aos doze dias. O sêmen foi avaliado, a cada 48 horas quanto à motilidade espermática, utilizado o Sperm Class Analyser® (SCA), e integridade de membranas pelo Teste Hiposmótico e coloração com PI/CFDA. A renovação do meio diluidor manteve constante a motilidade espermática e aumentou a longevidade do sêmen canino resfriado, sem, contudo influenciar a integridade de membranas.

### 6.2 ABSTRACT

We evaluated the effect of medium exchange on quality of chilled dog semen. Semen was collected from six dogs, diluted in a 1:1 ratio in Tris-Yolk medium, centrifuged at 500g/10min and resuspended to final concentration of  $50 \times 10^6$  sperm/mL. Semen was cooled at rates of 0.26 °C/min between 37 and 16°C, and 0.08 °C/min from 16 to 8°C, and then kept in a refrigerator for 14 days. In Treatment 1 medium was exchanged every six days and in Treatment 2 after twelve. Cooled semen was evaluated every 48 hours for sperm motility, using the Sperm Class Analyser® (SCA) and membrane integrity with hypoosmotic swelling test and PI/CFDA stain. Medium exchange sustained sperm motility and increased sperm longevity on collected dog semen, without however influencing membrane integrity.

### 6.3 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se visto grande crescimento na utilização de técnicas de inseminação artificial em diversas espécies domésticas, o que por sua vez fomenta o interesse em técnicas de criopreservação do sêmen. Na área de reprodução de cães o resfriamento de sêmen tem se destacado como ferramenta facilitadora do intercâmbio de material genético já que alia bons resultados de fertilidade e prolificidade a técnicas de processamento e utilização simples e de baixo custo (England e Ponzio, 1996; Ponglowhapan et al., 2004; Peña et al., 2006).

O primeiro nascimento obtido com uso de sêmen resfriado na espécie canina data de 1954. Na ocasião Harrop descreveu uma série de experimentos nos quais o sêmen era transportado de navio, da Europa até os Estados Unidos, onde ocorriam as inseminações.

Uma desvantagem do resfriamento de sêmen é sua relativa baixa longevidade, inicialmente estimada em 12-24h (Linde-Forsberg, 1991; Rota et al., 1995), e atualmente estendida para

até 48h (Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005). O ciclo estral da cadela é caracteristicamente longo, apresentando período fértil de 2-4 dias, com acentuada variação individual na duração do estro e momento da ovulação (Johnson et al., 2001). Assim, a logística de coleta e envio de sêmen canino precisa ser cuidadosamente planejada de forma que este seja disponível, em boas condições, no momento adequado para inseminação. Ainda, foi demonstrado que a realização de duas inseminações, com intervalo de 48h, durante o período fértil da cadela resulta em melhores taxas de fertilidade do que uma inseminação (Linde-Forsberg et al., 1999). Tendo em vista que o ejaculado contém 2-5 doses inseminantes, seria vantajoso estender a longevidade do sêmen resfriado, de forma a tornar possível a utilização fracionada em mais de uma inseminação.

Buscando alternativas para aumentar a longevidade do sêmen canino resfriado, Verstegen et al. (2005) observaram que a renovação do meio diluidor após longo período de armazenamento aparentemente restabeleceu a

motilidade de uma parcela dos espermatozoides imóveis. Os mecanismos associados ao aparente restabelecimento da motilidade espermática ainda não foram inteiramente esclarecidos, nem os possíveis efeitos da renovação do meio sobre a integridade das organelas e componentes espermáticos.

Considerando o conhecimento atual, busca-se esclarecer o efeito da renovação do meio diluidor na qualidade do sêmen canino resfriado e no período de sobrevivência dos espermatozoides.

#### 6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis cães, quatro da raça Labrador e dois da raça Shar Pei, com idade entre três e cinco anos, provenientes de canil particular. Os animais foram alojados em canis individuais de 6m<sup>2</sup> composto de área coberta com abrigo e solário, sendo alimentado com ração comercial oferecida duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Foram selecionados para o experimento cães que apresentem motilidade espermática acima de 70% e menos de 30% de espermatozoides morfológicamente anormais no ejaculado (Johnson et al., 2001). Antes do início do experimento os cães tiveram sua reserva espermática extra-gonadal esgotada (England, 1999).

A segunda fração do ejaculado, identificada pela coloração, foi coletada pelo método de manipulação digital do pênis (Linde-Forsberg, 2001), com auxílio de saco plástico, acoplado a um tubo tipo *falcon*. Imediatamente após a coleta o sêmen foi diluído, na proporção de 1:1 em meio Tris-Gema (Rota et al., 1995) previamente aquecido a 37°C, e centrifugado a 500g/10min. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado ressuspenso em meio Tris-Gema até concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O sêmen foi então resfriado, em caixa de poliestireno contendo gelo reutilizável, a taxa de 0,26 C°/min, entre 37 e 16 C°, e 0,08 C°/min, entre 16 e 8C° (para maiores detalhes vide seção 5.3). Após resfriado o sêmen foi mantido em geladeira a 5°C por 14 dias. Durante a conservação em geladeira, cada ejaculado foi dividido em dois tratamentos: no Tratamento 1 o meio diluidor foi renovado a cada seis dias e no Tratamento 2 o meio diluidor foi renovado, uma única vez após doze dias.

Para a renovação do meio diluidor, igual volume de meio recém-preparado, acondicionado em tubo tipo *falcon*, foi resfriado em geladeira por 2 horas. Em seguida o sêmen diluído foi centrifugado em centrífuga refrigerada (5°C), a 500 g por 10min. O sobrenadante foi desprezado, e o *pellet* ressuspenso em meio recém preparado ou no meio original conforme o tratamento experimental.

O sêmen resfriado foi avaliado, a cada 48 horas, quanto à motilidade espermática e integridade de membranas. Para avaliação da motilidade espermática foi utilizado o Sperm Class Analyser® (SCA) versão 4.0 da Microptic® (Barcelona, Espanha). As amostras resfriadas foram aquecidas em banho-maria a 37°C por 2 min e, em seguida, uma gota de 5µL foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C e acondicionada ao SCA. O *setup* foi ajustado para os padrões de sêmen canino pré-existent. Os espermatozoides foram classificados nas seguintes categorias: Móveis Rápidos Progressivos, aqueles com velocidade curvilínea (VCL) maior que 100 micron/s e retilinearidade (STR) maior que 75; Móveis Lentos Progressivos, aqueles com VCL entre 65 e 100 micron/s e STR maior que 75; Móveis Não Progressivos, aqueles com VCL maior que 10 micron/s e STR menor que 75; e Imóveis, aqueles com VCL menor que 10 micron/s. Foi avaliado também a retilinearidade (STR), relação entre espaço percorrido pelo espermatozoide e sua trajetória real e a linearidade (LIN) comparação entre trajetórias retas e curvilíneas, ambos expressos em escala de 0-100 (para maiores detalhes vide seção 5.4.2).

A integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides foi avaliada pelo Teste Hiposmótico (HO) de acordo com a técnica descrita por Kumi-Diaka (1993) utilizando solução de 60mosmol de frutose em água destilada. A porcentagem de células reativas ao Teste Hiposmótico foi corrigida segundo a fórmula proposta por Melo e Henry (1999) (para maiores detalhes vide seção 5.4.3).

A integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça e do acrossoma dos espermatozoides resfriados foi avaliada pela técnica da fluorescência, adotando-se os

fluorocromos o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP), segundo o protocolo proposto por Harrison e Vickers (1990) modificado por Zúccari (1998). Os espermatozoides foram classificados como: íntegros (completamente marcados pelo CFDA); lesados (completamente marcados pelo PI); e semi-lesados (marcados tanto pelo CFDA quanto pelo PI) (para maiores detalhes vide seção 5.4.4).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com parcelas subdivididas, sendo cão o bloco, o tratamento a parcela e o dia a subparcela. As variáveis apresentaram distribuição normal, e foram comparadas pela ANOVA utilizando o teste Tukey-Kramer com nível de significância de 5%, no programa SAS versão 2008. Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão.

## 6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de motilidade espermática diminuíram, de forma progressiva a partir do primeiro dia de resfriamento. Apesar disso só foi verificada diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de motilidade espermática a partir do sexto dia. A motilidade total média do sêmen resfriado variou entre 87% no Dia 0 e 57% no Dia 6, e a média de motilidade progressiva esteve entre 66 e 35% no mesmo período. A partir do sexto dia, e ao logo de todo o restante do período experimental, houve queda significativa diária da motilidade espermática.

De forma semelhante, apesar de os valores médios diminuírem progressivamente desde o primeiro dia, houve queda significativa nos parâmetros de integridade das membranas espermáticas da cabeça e acrossoma, avaliado pela coloração com PI/CFDA, apenas a partir do quarto dia de resfriamento. A média de espermatozoides íntegros variou entre 89% no Dia 0 e 81% no Dia 4, e a média de espermatozoides semi-lesados esteve entre 3 e 8% no mesmo período. Já a porcentagem de espermatozoides com membrana da cauda íntegras, avaliada pelo Teste Hiposmótico, sofreu queda progressiva, significativa, desde o primeiro dia de resfriamento.

A longevidade do sêmen canino resfriado foi inicialmente estimada em 12-24h (Linde-

Forsberg, 1991; Rota et al., 1995), e atualmente é estendida para até 48h (Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005; Peña et al., 2006). Apesar disso, no presente experimento, em ambos tratamentos, houve queda nos parâmetros de motilidade e integridade espermática apenas a partir do sexto e do quarto dia de resfriamento, respectivamente. Verstegen et al. (2005) descrevem manutenção da motilidade espermática constante por até 10 dias no sêmen canino diluído em meio Tris-Gema e resfriado a 4°C, enquanto Nizanski et al. (2009) descrevem manutenção de motilidade espermática satisfatória por até 7 dias nas mesmas condições. Já Rota et al. (1995) descrevem queda na motilidade espermática a partir do segundo dia de resfriamento do sêmen diluído em diversos meios. Verstegen et al. (2005) e Nizanski et al. (2009) não avaliaram quaisquer parâmetros de integridade de membranas espermáticas, mas Rota et al. (1995) verificaram queda na porcentagem de espermatozoides reativos ao Teste Hiposmótico, e na porcentagem de espermatozoides íntegros avaliados pela coloração com PI/CFDA já com 24 horas de resfriamento. Diferenças na metodologia, em especial na forma de avaliação da motilidade e integridade espermática, bem como no delineamento estatístico, podem em parte ser implicadas nas diferenças de resultados entre trabalhos, assim como a variabilidade individual.

O presente trabalho demonstrou que tanto a motilidade quanto a integridade espermáticas podem ser mantidas no sêmen canino resfriado por pelo menos 4 dias. Com base neste achado, bem como na literatura mais recente (Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005; Nizanski et al., 2009), pode-se especular que o tempo estimado de manutenção da longevidade e fertilidade do sêmen resfriado possa ser estendido por períodos superiores a 48 horas.

A centrifugação é um passo inerente à maioria dos protocolos de criopreservação do sêmen, no entanto, tanto a centrifugação quanto a ressuspensão do *pellet* tem sido associadas a injúrias mecânicas e oxidativas que se refletem na perda da motilidade e fertilidade do sêmen (Rijsselaere et al., 2002; Aurich, 2005; Matás et al., 2007). Se por um lado os danos associados à centrifugação são proporcionais à sua velocidade e duração, por outro, centrifugações

muito suaves resultam na perda de espermatozoides, eliminados suspensos no sobrenadante (Rijsselaere et al., 2002). Cunha e Lopes (1999) descrevem que a centrifugação a 800 g por 15 minutos não prejudicou a qualidade do sêmen canino fresco. Rijsselaere et al. (2002) avaliaram o efeito de quatro velocidades de centrifugação sobre qualidade do sêmen e a perda de células no sobrenadante e concluíram que a centrifugação a 720 g por 5 minutos apresentou mínima perda de células sem alteração da qualidade seminal. Já Davis et al. (2007) mensuraram a concentração de espécie de oxigênio reativo (ROS) antes e após a centrifugação do sêmen de cães a 700 g por 10 minutos e verificaram aumento de 200% na concentração de ROS após a centrifugação. No presente trabalho utilizou-se intensidade de centrifugação intermediária, sendo o sêmen de ambos os tratamentos centrifugado, em centrífuga refrigerada, a 500 g por 10 minutos. Mesmo assim, a centrifugação e ressuspensão dos espermatozoides teve efeito deletério sobre a qualidade do sêmen resfriado, provocando queda da motilidade espermática, mais perceptível nas amostras de sêmen que foram

centrifugadas e ressuspensas meio diluidor original (Tab. 1 - Tratamento 2).

Observando a Tab. 1, e comparando os resultados entre tratamentos, observa-se que após a renovação do meio, todos os parâmetros de motilidade espermática foram superiores no Tratamento 1, com renovação do meio, quando comparados ao Tratamento 2, sem renovação do meio. Comparando os valores de motilidade espermática antes e após a centrifugação e renovação ou não do meio diluidor, verifica-se que, em ambos os tratamentos, a renovação do meio diluidor seja no sexto ou no décimo segundo dia preservou a motilidade espermática, enquanto centrifugação e ressuspensão meio original provocou queda em todos os parâmetros de motilidade avaliados. A renovação do meio diluidor, tanto no sexto quanto no décimo segundo dia de resfriamento manteve a motilidade espermática, protegendo os espermatozoides dos efeitos deletérios da centrifugação.

Tabela 1 - Média + Desvio Padrão da porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, lentos progressivos, progressivos totais, móveis não progressivos, móveis totais e imóveis, de seis ejaculados caninos resfriados por 14 dias, antes (\*) e após (\*\*) a centrifugação e ressuspensão em meio diluidor recém preparado (T-1: dias 6 e 12; T-2: dia 12), ou centrifugação e ressuspensão no meio diluidor original (T-2 dia 6)

Dias	Rápidos Progressivos		Lentos Progressivos		Progressivos Totais		Móveis Não-Progressivos		Móveis Totais		Imóveis	
	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2
6*	19,17 ± 7,91	19,17 <sup>a</sup> ± 7,91	15,70 ± 7,43	15,70 <sup>a</sup> ± 7,43	34,87 ± 14,72	34,87 <sup>a</sup> ± 14,72	22,17 ± 7,90	22,17 ± 7,90	57,04 ± 15,07	57,04 <sup>a</sup> ± 15,07	42,96 ± 15,07	42,96 <sup>a</sup> ± 15,07
6**	17,85 <sup>A</sup> ± 6,43	12,65 <sup>Bb</sup> ± 8,51	15,74 <sup>A</sup> ± 5,33	8,45 <sup>Bb</sup> ± 3,30	33,59 <sup>A</sup> ± 10,11	21,11 <sup>Bb</sup> ± 10,93	21,81 <sup>A</sup> ± 7,51	15,14 <sup>B</sup> ± 2,35	55,40 <sup>A</sup> ± 14,18	36,25 <sup>Bb</sup> ± 10,18	44,60 <sup>A</sup> ± 4,18	63,75 <sup>Bb</sup> ± 0,18
12*	2,21 ± 4,19	1,09 ± 1,94	1,90 ± 3,75	1,16 ± 2,66	4,11 ± 7,91	2,24 ± 4,56	5,41 ± 5,47	1,83 ± 2,45	9,53 ± 13,29	4,08 ± 6,95	90,47 ± 13,29	95,92 ± 6,95
12**	1,83 ± 3,26	1,69 ± 3,34	1,51 ± 1,32	2,97 ± 5,81	3,34 ± 4,52	4,66 ± 9,12	6,50 ± 3,57	3,92 ± 5,96	9,84 ± 8,02	8,59 ± 14,76	90,15 ± 8,02	91,41 ± 14,76

Médias marcadas com letras maiúsculas na mesma linha ou minúsculas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

Na Tab. 2 estão demonstrados os valores médios dos diferentes parâmetros de motilidade espermática avaliados, em ambos os tratamentos, durante os 14 dias de armazenamento do sêmen canino resfriado. Nota-se que a partir do Dia 6, e nos quatro dias

seguintes a renovação do meio diluidor as amostras que sofreram renovação apresentaram motilidade espermática total superior às observadas nas amostras ressuspensas no meio original, evidenciando o efeito benéfico da renovação do diluidor sobre a longevidade

espermática. Pode-se ver, ainda, que a partir do Dia 6, e ao longo de todo o período experimental, os valores médios dos parâmetros de motilidade espermática avaliados foram superiores no Tratamento 1, quando comparados aos do Tratamento 2.

Nem a renovação do meio diluidor, nem a conservação do sêmen resfriado influenciaram, de forma imediata ou em longo prazo, o padrão de motilidade dos espermatozoides, uma vez que estes mantiveram tanto a linearidade quanto a retilinearidade do movimento constantes durante todo o experimento (Tabs. 4 e 5)

Tabela 2 - Média  $\pm$  Desvio Padrão da porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, lentos progressivos, progressivos totais, móveis não progressivos, móveis totais e imóveis, de seis ejaculados caninos resfriados por 14 dias.

Dias	Rápidos Progressivos		Lentos Progressivos		Progressivos Totais		Móveis Não-Progressivos		Móveis Totais		Imóveis	
	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2
0	39,90 $\pm$ 8,74	39,90 $\pm$ 8,74	26,08 $\pm$ 4,25	26,08 $\pm$ 4,25	65,97 $\pm$ 9,15	65,97 $\pm$ 9,15	20,78 $\pm$ 9,62	20,78 $\pm$ 9,62	86,75 $\pm$ 6,50	86,75 $\pm$ 6,50	13,25 $\pm$ 6,50	13,25 $\pm$ 6,50
2	37,04 $\pm$ 9,26	37,04 $\pm$ 9,26	23,79 $\pm$ 9,57	23,79 $\pm$ 9,57	60,82 $\pm$ 13,03	60,82 $\pm$ 13,03	22,15 $\pm$ 10,50	22,15 $\pm$ 10,50	82,97 $\pm$ 7,89	82,97 $\pm$ 7,89	17,03 $\pm$ 7,89	17,03 $\pm$ 7,89
4	33,79 $\pm$ 6,66	33,79 $\pm$ 6,66	23,30 $\pm$ 8,61	23,30 $\pm$ 8,61	57,09 $\pm$ 11,83	57,09 $\pm$ 11,83	23,99 $\pm$ 9,15	23,99 $\pm$ 9,15	81,08 $\pm$ 5,79	81,08 $\pm$ 5,79	18,92 $\pm$ 5,79	18,92 $\pm$ 5,79
6	19,17 $\pm$ 7,91	19,17 $\pm$ 7,91	15,70 $\pm$ 7,43	15,70 $\pm$ 7,43	34,87 $\pm$ 14,72	34,87 $\pm$ 14,72	22,17 $\pm$ 7,90	22,17 $\pm$ 7,90	57,04 $\pm$ 15,07	57,04 $\pm$ 15,07	42,96 $\pm$ 15,07	42,96 $\pm$ 15,07
8	10,79 $\pm$ 6,80	8,69 $\pm$ 10,91	9,28 $\pm$ 5,65	8,48 $\pm$ 4,68	20,07 $\pm$ 12,16	17,17 $\pm$ 14,75	21,10 <sup>A</sup> $\pm$ 7,32	11,89 <sup>B</sup> $\pm$ 4,56	41,17 <sup>A</sup> $\pm$ 15,75	29,07 <sup>B</sup> $\pm$ 16,21	58,83 <sup>A</sup> $\pm$ 15,75	70,93 <sup>B</sup> $\pm$ 16,21
10	5,38 $\pm$ 6,80	2,95 $\pm$ 4,42	7,15 $\pm$ 7,18	3,40 $\pm$ 4,00	12,53 $\pm$ 13,83	6,34 $\pm$ 8,38	13,74 <sup>A</sup> $\pm$ 5,27	4,61 <sup>B</sup> $\pm$ 4,17	26,26 <sup>A</sup> $\pm$ 17,21	10,95 <sup>B</sup> $\pm$ 11,64	73,73 <sup>A</sup> $\pm$ 17,21	89,05 <sup>B</sup> $\pm$ 11,64
12	2,21 $\pm$ 4,19	1,09 $\pm$ 1,94	1,90 $\pm$ 3,75	1,16 $\pm$ 2,66	4,11 $\pm$ 7,91	2,24 $\pm$ 4,56	5,41 $\pm$ 5,47	1,83 $\pm$ 2,45	9,53 $\pm$ 13,29	4,08 $\pm$ 6,95	90,47 $\pm$ 13,29	95,92 $\pm$ 6,95
14	0,87 $\pm$ 1,43	0,46 $\pm$ 0,85	0,73 $\pm$ 1,32	0,25 $\pm$ 0,30	1,60 $\pm$ 2,70	0,71 $\pm$ 0,78	2,43 $\pm$ 2,20	0,51 $\pm$ 0,82	4,03 $\pm$ 3,91	8,59 $\pm$ 1,58	95,97 $\pm$ 3,91	98,77 $\pm$ 1,58

Médias marcadas com letras maiúsculas na mesma linha diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

T-1: sêmen submetido à renovação do meio diluidor a cada 6 dias

T-2: sêmen submetido à renovação após 12 dias

Os mecanismos envolvidos na manutenção da motilidade espermática associada à renovação do meio diluidor ainda não foram completamente esclarecidos, no entanto é possível que a renovação do meio influencie a fisiologia dos espermatozoides resfriados aumentando a disponibilidade de moléculas como açúcares e lipoproteínas, removendo radicais livres, enzimas e outros catabólitos, bem como restabelecendo o pH do meio. A presença de pH adequado tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular é essencial para manutenção da vitalidade e

longevidade das células. Na primeira fase deste trabalho avaliou-se o comportamento de ejaculados individualizados, e em função disso, o volume das amostras era pequeno e não foi possível avaliar as alterações no pH. Numa segunda etapa, em que foi avaliado o comportamento de *pools* de sêmen submetidos às mesmas condições experimentais, os valores de pH no sêmen resfriado variaram entre 6,3 no Dia 0 e 5,9 no Dia 14. A renovação do meio diluidor foi sempre associada ao restabelecimento do pH fisiológico do sêmen resfriado.

Alterações no pH do meio, em especial a acidificação, tem sido associadas à queda da motilidade e fertilidade espermática durante a conservação do sêmen resfriado e à temperatura ambiente (Norman et al., 1958; Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005). Norman et al. (1958) estudando a preservação do sêmen bovino a temperatura ambiente observaram diminuição na motilidade espermática, no consumo de oxigênio e possivelmente no metabolismo geral associado à acidificação do meio. Este efeito foi revertido com a renovação do meio diluidor, e consequente restabelecimento do pH, após 150 horas de armazenamento. Ponglowhapan et al. (2004) avaliando o efeito da adição de glicose e frutose ao meio diluidor para esfriamento de sêmen canino descrevem queda progressiva da motilidade associada à acidificação. Já Verstegen et al. (2005) descreveram queda do pH durante o armazenamento do sêmen a 4°C de 6,8 no Dia 1 para 6,6 no Dia 13.

Em seu trabalho, Verstegen et al. propuseram a renovação do meio diluidor quando a motilidade espermática atingir valores estatisticamente diferente da motilidade inicial, o que ocorreu a princípio após 11 dias de preservação do sêmen. O período de manutenção da motilidade inicial verificado no trabalho de Verstegen et al. (2005), de 11 dias, foi mais que o dobro do verificado no presente trabalho, de 4 dias, e nos trabalhos de Ponglowhapan et al. (2004), de 3 dias e Rota et al. (1995) de 2 dias, sendo ainda maior que o observado por Nizansk et al. (2009), de 7 dias. Embora no presente trabalho a primeira renovação do meio diluidor tenha ocorrido após seis dias de resfriamento, a motilidade total do sêmen (57%) era inferior ao descrito por Verstegen et al. (2005) aos onze dias de

resfriamento (68%). No presente trabalho a renovação do meio diluidor restabeleceu o pH inicial do sêmen resfriado, tanto no Dia 6 quanto no Dia 12, e em ambos momentos foi associada a manutenção da motilidade espermática. Já Verstegen et al. (2005) descrevem que o restabelecimento do pH fisiológico em função da renovação do meio diluidor nos Dias 11, 13 e 21 foi sempre acompanhado de restabelecimento parcial e decrescente da motilidade espermática. Estes autores trabalharam unicamente com *pool* de sêmen de cães provenientes de um canil experimental.

No presente trabalho embora os cães utilizados sejam de comprovada fertilidade e tenham passado por completo exame andrológico antes do início experimento, na expectativa de melhor refletir a aplicação do procedimento a campo, propositalmente eles não foram selecionados segundo a criotolerância espermática. A Tab. 3 traz a porcentagem de espermatozoides móveis progressivos e móveis totais no sêmen resfriado de dois cães, que representam os extremos de variabilidade individual observados neste trabalho. Pode-se perceber que, embora no Dia 0 a motilidade espermática seja semelhante entre os dois cães, no Dia 6 a diferença na motilidade total e motilidade progressiva é de mais de 100%. A variação individual na criotolerância do sêmen resfriado é grande entre cães mesmo em um ambiente experimental controlado, o que e pode explicar, em parte, as diferenças encontradas na literatura quanto à longevidade do sêmen canino resfriado. Embora a motilidade espermática e longevidade do sêmen tenham variado individualmente a resposta à renovação do meio diluidor foi a mesma em todos os indivíduos.

Tabela 3 - Média de porcentagem de espermatozoides móveis progressivos e móveis totais no sêmen de dois cães, resfriado por 14 dias e submetido à renovação periódica do meio diluidor a cada 6 dias.

		Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12	Dia 14
<b>Motilidade Progressiva</b>	<i>Cão 1</i>	77,13	44,26	35,87	14,29	6,78	1,66	0,85	0,00
	<i>Cão 2</i>	83,20	74,03	61,30	33,14	31,69	18,70	1,65	2,40
<b>Motilidade Total</b>	<i>Cão 1</i>	89,24	80,87	70,65	29,56	18,08	8,31	2,54	0,00
	<i>Cão 2</i>	92,54	94,53	84,52	65,12	63,93	34,78	7,82	5,39

Tanto a centrifugação do sêmen, quanto a renovação do meio diluidor, seja periódica ou após doze dias, não exerceram efeitos

perceptíveis, benéficos ou maléficos, imediatos ou de longo prazo, sobre a integridade de membranas (Tabs. 4 e 5).

Tabela 4 - Média  $\pm$  Desvio Padrão da porcentagem de espermatozoides íntegros, semi-lesados e lesados, avaliados pela coloração com PI/CFDA, média de espermatozoides reativos ao Teste Hiposmótico e linearidade e retilinearidade espermáticas, de seis ejaculados caninos resfriados por 14 dias, antes (\*) e após (\*\*) a centrifugação e ressuspensão em meio diluidor recém preparado (T-1: dias 6 e 12; T-2: dia 12), ou centrifugação e ressuspensão no meio diluidor original (T-2 dia 6).

Dias	Íntegros		Semi-Lesados		Lesados		Reativos-HO		Linearidade		Retilinearidade	
	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2
6*	76,67 $\pm 11,93$	76,67 $\pm 11,93$	13,83 $\pm 6,59$	13,83 $\pm 6,59$	9,50 $\pm 5,65$	9,50 $\pm 5,65$	46,00 $\pm 15,27$	46,00 $\pm 15,27$	46,64 $\pm 3,30$	46,64 $\pm 3,30$	77,11 $\pm 2,69$	77,11 $\pm 2,69$
6**	74,17 $\pm 7,17$	79,17 $\pm 6,37$	15,00 $\pm 5,55$	12,33 $\pm 5,65$	10,83 $\pm 1,72$	8,50 $\pm 2,51$	42,17 $\pm 17,45$	40,83 $\pm 17,67$	43,59 $\pm 6,87$	43,56 $\pm 5,45$	76,09 $\pm 5,25$	76,33 $\pm 6,99$
12*	48,33 $\pm 11,27$	42,33 $\pm 21,34$	22,67 $\pm 14,73$	26,50 $\pm 20,07$	29,00 $\pm 5,66$	27,83 $\pm 11,84$	25,17 $\pm 9,70$	23,00 $\pm 9,55$	41,11 $\pm 9,42$	42,81 $\pm 6,84$	74,87 $\pm 10,76$	75,02 $\pm 8,34$
12**	49,17 $\pm 13,00$	46,33 $\pm 14,46$	17,83 $\pm 3,97$	19,67 $\pm 12,11$	33,00 $\pm 10,35$	34,00 $\pm 13,04$	23,10 <sup>A</sup> $\pm 9,81$	16,10 <sup>B</sup> $\pm 9,77$	41,92 $\pm 9,03$	47,32 $\pm 4,48$	73,21 $\pm 11,24$	80,36 $\pm 4,62$

Médias marcadas com letras maiúsculas na mesma linha diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

Tabela 5 - Média  $\pm$  Desvio Padrão da porcentagem de espermatozoides íntegros, semi-lesados e lesados, avaliados pela coloração com PI/CFDA, média de espermatozoides reativos ao Teste Hiposmótico e linearidade e retilinearidade espermáticas, de seis ejaculados caninos resfriados por 14 dias.

Dias	Íntegros		Semi-Lesados		Lesados		Reativos-HO		Linearidade		Retilinearidade	
	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2	T-1	T-2
0	89,00 $\pm 7,80$	89,00 $\pm 7,80$	3,00 $\pm 2,28$	3,00 $\pm 2,28$	8,00 $\pm 5,66$	8,00 $\pm 5,66$	87,83 $\pm 4,26$	87,83 $\pm 4,26$	57,60 $\pm 5,51$	57,60 $\pm 5,51$	81,37 $\pm 3,16$	81,37 $\pm 3,16$
2	81,17 $\pm 5,00$	81,17 $\pm 5,00$	8,50 $\pm 3,27$	8,50 $\pm 3,27$	10,33 $\pm 5,01$	10,33 $\pm 5,01$	65,00 $\pm 20,71$	65,00 $\pm 20,71$	57,63 $\pm 6,93$	57,63 $\pm 6,93$	82,13 $\pm 4,62$	82,13 $\pm 4,62$
4	75,67 $\pm 6,50$	75,67 $\pm 6,50$	8,33 $\pm 3,67$	8,33 $\pm 3,67$	16,00 $\pm 6,51$	16,00 $\pm 6,51$	62,83 $\pm 19,73$	62,83 $\pm 19,73$	51,49 $\pm 5,33$	51,49 $\pm 5,33$	79,71 $\pm 3,27$	79,71 $\pm 3,27$
6	76,67 $\pm 11,93$	76,67 $\pm 11,93$	13,83 $\pm 6,59$	13,83 $\pm 6,59$	9,50 $\pm 5,65$	9,50 $\pm 5,65$	46,00 $\pm 15,27$	46,00 $\pm 15,27$	46,64 $\pm 3,30$	46,64 $\pm 3,30$	77,11 $\pm 2,69$	77,11 $\pm 2,69$
8	68,00 $\pm 9,74$	70,00 $\pm 14,39$	15,50 $\pm 9,07$	15,83 $\pm 12,11$	16,50 $\pm 5,68$	14,17 $\pm 7,19$	37,00 $\pm 16,52$	35,67 $\pm 15,36$	47,38 $\pm 4,15$	49,91 $\pm 1,83$	77,26 $\pm 3,89$	80,63 $\pm 1,80$
10	55,67 <sup>A</sup> $\pm 10,93$	65,17 <sup>B</sup> $\pm 13,20$	20,83 $\pm 8,84$	16,00 $\pm 11,68$	23,67 $\pm 3,44$	19,00 $\pm 4,86$	34,50 $\pm 13,71$	28,67 $\pm 15,92$	44,72 $\pm 6,03$	46,39 $\pm 2,62$	77,57 $\pm 5,66$	77,87 $\pm 1,78$
12	48,33 $\pm 11,27$	42,33 $\pm 21,34$	22,67 $\pm 14,73$	26,50 $\pm 20,07$	29,00 $\pm 5,66$	27,83 $\pm 11,84$	25,17 $\pm 9,70$	23,00 $\pm 9,55$	41,11 $\pm 9,42$	42,81 $\pm 6,84$	74,87 $\pm 10,76$	75,02 $\pm 8,34$
14	39,00 $\pm 12,90$	38,33 $\pm 12,14$	21,67 $\pm 11,31$	17,33 $\pm 9,44$	39,33 $\pm 9,77$	44,33 $\pm 9,56$	20,83 $\pm 10,15$	14,16 $\pm 7,94$	41,26 $\pm 6,21$	46,30 $\pm 3,11$	48,78 $\pm 38,37$	79,90 $\pm 4,44$

Médias marcadas com letras maiúsculas na mesma linha diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

T-1: sêmen submetido à renovação do meio diluidor a cada 6 dias

T-2: sêmen submetido à renovação do meio diluidor após 12 dias

A diluição, o resfriamento e a preservação de espermatozoides resfriados tem sido amplamente associado à queda progressiva da integridade de membranas plasmáticas e acrossoma (Rota et al., 1995; Ponglowhapan et

al., 2004 Shahiduzzaman e Linde-Frosberg, 2007; Lopes et al., 2009) e vários estudos têm avaliado o papel de alguns componentes de meios diluidores como macromoléculas proteicas, tampões e anti-oxidantes na

prevenção destes danos (Verstegen et al., 2005; Bergeron e Manjunath, 2006; Michael et al., 2009; Rocha et al., 2009; Varela Júnior, 2009). Apesar disso, não foi encontrado na literatura estudo sobre o efeito da renovação do meio diluidor na integridade das membranas dos

#### 6.6 CONCLUSÃO

A renovação do meio diluidor manteve constante a motilidade espermática e aumentou a longevidade do sêmen canino resfriado. A integridade das membranas espermáticas não foi influenciada pela renovação do meio diluidor.

espermatozoides caninos. Neste trabalho encontrou-se que a integridade das membranas espermáticas diminuiu progressivamente a partir quarto dia de resfriamento do sêmen, independente da renovação do meio diluidor.

#### 6.7 REFERENCIAS

Vide seção 11.

## 7 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DE EJACULADOS INDIVIDUAIS E POOLS DE SÊMEN CANINO RESFRIADO, SUBMETIDOS ÀS MESMAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

### 7.1 RESUMO

Avaliou-se os resultados obtidos a partir de ejaculados caninos individuais e *pools* de sêmen submetidos a dois tratamentos de renovação do meio diluidor. Sêmen de seis cães foi coletado, na forma de ejaculados individuais e *pools* de sêmen, diluído na proporção de 1:1 em meio Tris-Gema, centrifugado a 500g/10min, e o *pellet* ressuspensionado até concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O sêmen foi resfriado a 0,26 °C /min, entre 37 e 16 °C, e 0,08 °C /min, entre 16 a 8 °C e mantido em geladeira a 5 °C por 14 dias. No Tratamento 1 o meio diluidor foi renovado a cada seis dias e no Tratamento 2 aos doze dias. O sêmen foi avaliado, a cada 48 horas quanto à motilidade espermática, utilizado o Sperm Class Analyser® (SCA), e integridade de membranas pelo Teste Hiposmótico e coloração com PI/CFDA. A formação de *pools* de sêmen simplificou sua manipulação principalmente no que diz respeito ao aumento do volume do material de trabalho, no entanto resultados obtidos a partir de ejaculados individuais mostraram diferenças entre tratamentos não identificadas nos *pools* de sêmen.

### 7.2 ABSTRACT

We evaluated the results obtain with individual ejaculates and polled dog semen submitted to tow treatments of medium exchange. Semen was collected from six dogs, as individual ejaculates and polled semen, diluted in a 1:1 ratio in Tris-Yolk medium, centrifuged at 500g/10min and resuspended to final concentration of  $50 \times 10^6$  spz/mL. Semen was cooled at rates of 0.26 °C/min between 37 and 1°C, and 0.08 °C/min from 16 to 8°C, and then kept in a refrigerator for 14 days. In Treatement 1 medium was exchange every six days and in Treatment 2 after twelve dais. Cooled semen was evaluated every 48 hours form sperm motility, using the Sperm Calss Analyser® (SCA) and membrane integrity with hiposmotic swelling test and PI/CFDA stain. *Pool* semen formation made it easier to handle semen samples, mainly in respect increase work material volume. When submitted to medium exchange *pooled* semen behaved similarly to individual ejaculates, however data obtained from individual ejaculates was able to establish differences between treatments not apparent in *pooled* semen data.

### 7.3 INTRODUÇÃO

Entre as espécies domésticas o cão é uma das que apresenta menor produção espermática diária e menor número de espermatozoides por ejaculado, ficando à frente apenas do gato (Threlfall, 2003). O volume e numero total de espermatozoides no ejaculado canino muitas vezes limitam o delineamento experimental, principalmente quando se pretende submeter o ejaculado a diversos tratamentos ou realizar análises que demandam grandes volumes de material. No intuito de contornar estas limitações vários trabalhos na área de resfriamento de sêmen canino utilizam como unidade experimental *pools* de sêmen. Alguns pesquisadores defendem ainda que a utilização de *pools* minimiza o efeito do indivíduo, melhorando os parâmetros estatísticos e a confiabilidade dos resultados (Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005;

Shahiduzzaman e Linde-Frosberg, 2007; Lopes et al., 2009; Michael et al., 2009).

Na formação de *pools* de sêmen, mais do que agrupamento de espermatozoides, são agrupados proteínas, enzimas e outros componentes cuja interação e efeito sobre a crioresistência ainda não são esclarecidos. Sabe-se que algumas proteínas componentes do plasma seminal, como as proteínas com a finidade pela heparina, têm papel fundamental, no processo de capacitação espermática, e também influenciando a resistência individual dos espermatozoides à criopreservação (Manjunath et al., 2002; Moore et al., 2005; Souza et al., 2006).

O objetivo do presente trabalho é avaliar os resultados obtidos a partir de ejaculados caninos resfriados na forma de ejaculados individuais e *pools* de sêmen, e submetidos aos mesmos tratamentos de renovação do meio diluidor.

#### 7.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis cães, dois da raça Labrador e dois da raça Shar Pei, com idade entre três e cinco anos, provenientes de canil particular. Os animais foram alojados em canis individuais de 6m<sup>2</sup> composto de área coberta com abrigo e solário, sendo alimentado com ração comercial oferecida duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Foram selecionados para o experimento cães que apresentem motilidade espermática acima de 70% e menos de 30% de espermatozoides morfológicamente anormais no ejaculado (Johnson et al., 2001). Antes do início do experimento os cães tiveram sua reserva espermática extra-gonadal esgotada (England, 1999).

A segunda fração do ejaculado, identificada pela coloração, foi coletada pelo método de manipulação digital do pênis (Linde-Forsberg, 2001), com auxílio de saco plástico, acoplado a um tubo tipo *falcon*. Para avaliação de ejaculados individuais foi realizada, em um só dia, uma coleta de sêmen de cada um dos seis cães, e cada ejaculado foi tratado como uma unidade experimental. Para avaliação dos *pools* de sêmen, também foram utilizados seis *pools*, sendo cada pool formado por seis ejaculados completos, um de cada cão. Para formação de cada *pool* foi coletado um ejaculado de cada cão, sendo que todos ejaculados formadores de um pool foram coletados no mesmo dia. Os *pool* foram formados com intervalo de 2 a 3 dias entre si. Cada *pool* foi tratado como uma unidade experimental.

Imediatamente após a coleta o sêmen foi diluído, na proporção de 1:1 em meio Tris-Gema (Rota et al., 1995) previamente aquecido a 37°C, e centrifugado a 500g/10min. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado ressuspensionado em meio Tris-Gema até concentração final de 50 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. O sêmen foi então resfriado, em caixa de poliestireno contendo gelo reutilizável, a taxa de 0,26 C°/min, entre 37 e 16 C°, e 0,08 C°/min, entre 16 e 8C° (para maiores detalhes vide seção 5.3). Após resfriado o sêmen foi mantido em geladeira a 5°C por 14 dias. Durante a conservação em geladeira, cada ejaculado, ou cada *pool* de ejaculados foi dividido em dois tratamentos. No Tratamento 1 o meio diluidor foi renovado a cada seis dias e no Tratamento 2 o meio diluidor foi renovado

após doze dias. Para a renovação do meio diluidor, igual volume de meio recém-preparado, acondicionado em tubo tipo *falcon*, foi resfriado em geladeira por 2 horas. Em seguida o sêmen diluído foi centrifugado em centrífuga refrigerada (5°C), a 500 g por 10min. O sobrenadante foi desprezado, e o *pellet* ressuspensionado em meio recém preparado ou no meio original conforme o tratamento experimental.

O sêmen resfriado foi avaliado, a cada 48 horas, quanto à motilidade espermática e integridade de membranas. Para avaliação da motilidade espermática foi utilizado o Sperm Class Analyser® (SCA) versão 4.0 da Microptic© (Barcelona, Espanha). As amostras resfriadas foram aquecidas em banho-maria a 37°C por 2 min e, em seguida, uma gota de 5µL foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C e acondicionada ao SCA. O *setup* foi ajustado para os padrões de sêmen canino pré-existent. Os espermatozoides foram classificados nas seguintes categorias: Móveis Rápidos Progressivos, aqueles com velocidade curvilínea (VCL) maior que 100 micron/s e retilinearidade (STR) maior que 75; Móveis Progressivos Totais, aqueles com VCL maior que 10 micron/s e STR maior que 75; e Móveis Totais aqueles com VCL maior que 10 micron/s. Foi avaliado também a retilinearidade (STR), relação entre espaço percorrido pelo espermatozoide e sua trajetória real e a linearidade (LIN) comparação entre trajetos retos e curvilíneos, ambos expressos em escala de 0-100 (para maiores detalhes vide seção 5.4.2).

A integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides foi avaliada pelo Teste Hiposmótico (HO) de acordo com a técnica descrita por Kumi-Diaka (1993) utilizando solução de 60mosmol de frutose em água destilada. A porcentagem de células reativas ao Teste Hiposmótico foi corrigida segundo a fórmula proposta por Melo e Henry (1999) (para maiores detalhes vide seção 5.4.3).

A integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça e do acrossoma dos espermatozoides resfriados foi avaliada pela técnica da fluorescência, adotando-se os fluorocromos o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP), segundo o

protocolo proposto por Harrison e Vickers (1990) modificado por Zúccari (1998). Os espermatozoides foram classificados como: íntegros (completamente corados pelo CFDA); lesados (completamente corados pelo PI); e semi-lesados (corados tanto pelo CFDA quanto pelo PI) (para maiores detalhes vide seção 5.4.4).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com parcelas subdivididas, sendo cão ou o *pool* de sêmen o bloco, o tratamento a parcela e o dia a subparcela. As variáveis apresentaram distribuição normal, e foram comparadas pela ANOVA utilizando o teste Tukey-Kramer com nível de significância de 5%, no programa SAS versão 2008. Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão.

## 7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando as Figs. 6 e 7 verifica-se que, quando submetidos à centrifugação e renovação ou não do meio diluidor, os *pools* de sêmen tiveram comportamento semelhante aos de ejaculados individuais. Em ambos a renovação do meio diluidor foi associada à manutenção da motilidade espermática, enquanto a centrifugação e ressuspensão no meio original foram associadas à queda da motilidade espermática.

A variabilidade na qualidade do sêmen e resistência a criopreservação é uma característica inerente à espécie canina e, se por um lado o agrupamento de ejaculados em *pools* pode diminuir a variabilidade de respostas e melhorar os parâmetros estatísticos, por outro se corre o risco de perder detalhes individuais relevantes, que podem refletir de forma mais condizente a realidade. A formação de *pools* possibilitou a realização de análises que não eram possíveis com ejaculados individuais. Os *pools* de sêmen reagiram aos tratamentos de forma semelhante aos ejaculados individuais, mas os resultados obtidos a partir de ejaculados individuais mostraram diferenças entre os tratamentos não detectadas nos *pools*.

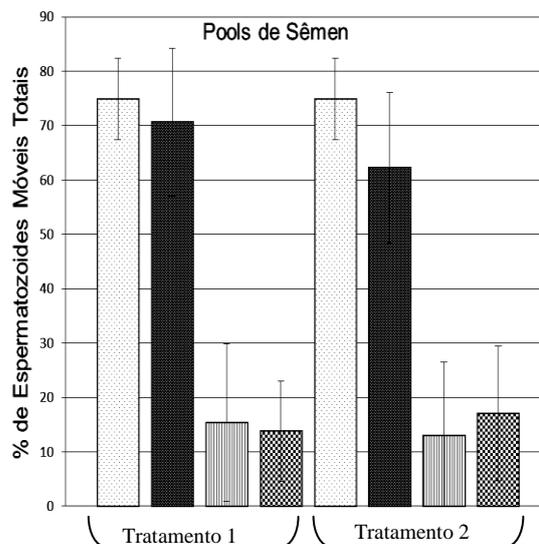


Figura 6 Média de motilidade progressiva de seis *pools* caninos resfriados: no Dia 6 antes (□) e após (■) a renovação do meio diluidor no tratamento 1 e a centrifugação e ressuspensão no meio original no tratamento 2; e no Dia 12 antes (▨) e após (▩) da renovação do meio diluidor em ambos tratamentos.

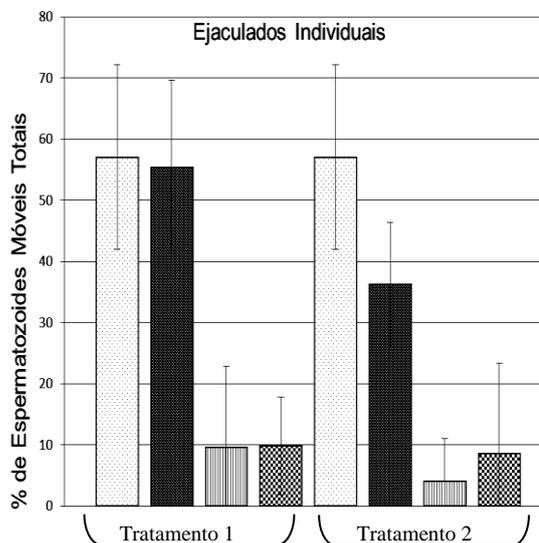


Figura 7- Média de motilidade progressiva de seis ejaculados caninos resfriados: no Dia 6 antes (□) e após (■) a renovação do meio diluidor no tratamento 1 e a centrifugação e ressuspensão no meio original no tratamento 2; e no Dia 12 antes (▨) e após (▩) da renovação do meio diluidor em ambos tratamentos.

Observando a Tab. 6, e comparando as valores de motilidade espermática nos Tratamentos 1 e 2 após obtidos a partir de pools de sêmen e de ejaculados individuais verifica-se que a renovação do meio diluidor foi associada à manutenção de todos os parâmetros de motilidade tanto nos ejaculados individuais quanto nos *pools* de sêmen. De forma semelhante a centrifugação e ressuspensão no meio diluidor original foi acompanhada de

queda nos parâmetros de motilidade espermática nos ejaculados individuais e nos *pools* de sêmen, com exceção da porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, cujos valores observados nos pools antes e após a centrifugação de sêmen não diferiram estatisticamente.

Tabela 6 - Média  $\pm$  Desvio Padrão da porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, progressivos totais e móveis totais e imóveis de *pools* de sêmen e ejaculados individuais caninos resfriados por 14 dias, antes e após o tratamento de centrifugação e ressuspensão em meio diluidor recém preparado (T-1: dias 6 e 12; T-2: dia 12), ou centrifugação e ressuspensão no meio diluidor original (T-2 dia 6).

			Dia 6 antes do tratamento	Dia 6 após do tratamento	Dia 12 antes do tratamento	Dia 12 após do tratamento
<b>Rápidos Progressivos</b>	T-1	Pool	43,08 $\pm$ 5,56	40,04 $\pm$ 10,86	5,19 $\pm$ 7,48	3,82 $\pm$ 3,37
		Ejac. Indv.	19,17 $\pm$ 7,91	17,85 $\pm$ 6,43	2,21 $\pm$ 4,19	1,83 $\pm$ 3,26
	T-2	Pool	43,08 $\pm$ 5,56	36,87 $\pm$ 12,74	3,51 $\pm$ 3,99	5,43 $\pm$ 3,95
		Ejac. Indv.	19,17 <sup>a</sup> $\pm$ 7,91	12,65 <sup>b</sup> $\pm$ 8,51	1,09 $\pm$ 1,94	1,69 $\pm$ 3,34
<b>Progressivos Totais</b>	T-1	Pool	64,97 $\pm$ 7,29	57,53 $\pm$ 14,91	9,01 $\pm$ 10,64	6,67 $\pm$ 4,46
		Ejac. Indv.	34,87 $\pm$ 14,72	33,59 $\pm$ 10,11	4,11 $\pm$ 7,91	3,34 $\pm$ 4,52
	T-2	Pool	64,97 <sup>a</sup> $\pm$ 7,29	52,31 <sup>b</sup> $\pm$ 15,13	5,02 $\pm$ 5,60	7,83 $\pm$ 5,22
		Ejac. Indv.	34,87 <sup>a</sup> $\pm$ 14,72	21,1 <sup>b</sup> $\pm$ 10,93	2,24 $\pm$ 4,56	4,66 $\pm$ 9,12
<b>Móveis Totais</b>	T-1	Pool	74,89 $\pm$ 7,47	70,66 $\pm$ 13,55	15,41 $\pm$ 14,50	13,83 $\pm$ 9,24
		Ejac. Indv.	57,04 $\pm$ 15,07	55,40 $\pm$ 14,18	9,53 $\pm$ 13,29	9,84 $\pm$ 8,02
	T-2	Pool	74,89 <sup>a</sup> $\pm$ 7,47	62,26 <sup>b</sup> $\pm$ 13,86	12,95 $\pm$ 13,59	17,02 $\pm$ 12,42
		Ejac. Indv.	57,04 <sup>a</sup> $\pm$ 15,07	36,25 <sup>b</sup> $\pm$ 10,18	4,08 $\pm$ 6,95	8,59 $\pm$ 14,76

Médias marcadas com letras minúsculas na mesma linha diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

T-1: sêmen submetido à renovação do meio diluidor a cada 6 dias.

T-2: sêmen submetido à renovação do meio diluidor após 12 dias.

Avaliando a Tab. 7 nota-se que a partir do Dia 6, quando foi realizado o primeiro procedimento de centrifugação e renovação ou não do meio diluidor, e ao longo de todo o período experimental, os valores médios da maioria dos parâmetros de motilidade espermática, tanto nos *pools* de sêmen quanto nos ejaculados individuais foram superiores no Tratamento 1,

quando comparados ao Tratamento 2. No entanto, só foi possível estabelecer diferença estatística entre os Tratamentos 1 e 2 nos resultados obtidos a partir de ejaculados individuais, onde a média de espermatozoides móveis totais foi superior no Tratamento 1 nos Dias 8 e 10.

Tabela 7- Média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, progressivos totais, e móveis totais de *pools* de sêmen e ejaculados individuais canino resfriados por 14 dias e submetidos a dois tratamentos de renovação do meio diluidor.

Dias	Rápidos Progressivos				Progressivos Totais				Móveis Totais			
	Pool		Ejac. Indv		Pool		Ejac. Indv		Pool		Ejac. Indv	
	T-1	T-2.	T-1	T-2.	T-1	T-2.	T-1	T-2.	T-1	T-2.	T-1	T-2.
0	41,52 $\pm 12,29$	41,52 $\pm 12,29$	39,90 $\pm 8,74$	39,90 $\pm 8,74$	73,71 $\pm 9,75$	73,71 $\pm 9,75$	65,97 $\pm 9,15$	65,97 $\pm 9,15$	86,80 $\pm 7,78$	86,80 $\pm 7,78$	86,75 $\pm$ 6,50	86,75 $\pm$ 6,50
2	53,92 $\pm 5,96$	53,92 $\pm 5,96$	37,04 $\pm 9,26$	37,04 $\pm 9,26$	80,44 $\pm 4,54$	80,44 $\pm 4,54$	60,82 $\pm 13,03$	60,82 $\pm 13,03$	87,20 $\pm 2,03$	87,20 $\pm 2,03$	82,97 $\pm$ 7,89	82,97 $\pm$ 7,89
4	44,87 $\pm 11,93$	44,87 $\pm 11,93$	33,79 $\pm 6,66$	33,79 $\pm 6,66$	71,11 $\pm 13,05$	71,11 $\pm 13,05$	57,09 $\pm 11,83$	57,09 $\pm 11,83$	86,76 $\pm 7,54$	86,76 $\pm 7,54$	81,08 $\pm$ 5,79	81,08 $\pm$ 5,79
6	43,08 $\pm 5,56$	43,08 $\pm 5,56$	19,17 $\pm 7,91$	19,17 $\pm 7,91$	64,97 $\pm 7,29$	64,97 $\pm 7,29$	34,87 $\pm 14,72$	34,87 $\pm 14,72$	74,89 $\pm 7,47$	74,89 $\pm 7,47$	57,04 $\pm 15,07$	57,04 $\pm 15,07$
8	35,71 $\pm 4,41$	31,27 $\pm 16,09$	10,79 $\pm 6,80$	8,69 $\pm 10,91$	51,59 $\pm 7,35$	42,90 $\pm 17,48$	20,07 $\pm 12,16$	17,17 $\pm 14,75$	61,79 $\pm 10,12$	54,30 $\pm 18,46$	41,17 <sup>a</sup> $\pm 15,75$	29,07 <sup>b</sup> $\pm 16,21$
10	19,91 $\pm 14,18$	19,98 $\pm 8,47$	5,38 $\pm 6,80$	2,95 $\pm$ 4,42	30,55 $\pm 14,52$	30,42 $\pm 10,59$	12,53 $\pm 13,83$	6,34 $\pm$ 8,38	41,74 $\pm 12,48$	42,27 $\pm 11,30$	26,26 <sup>a</sup> $\pm 17,21$	10,95 <sup>b</sup> $\pm 11,64$
12	5,19 $\pm 7,48$	3,51 $\pm 3,99$	2,21 $\pm 4,19$	1,09 $\pm 1,94$	9,01 $\pm 10,64$	5,02 $\pm 5,60$	4,11 $\pm 7,91$	2,24 $\pm$ 4,56	15,41 $\pm 14,50$	12,95 $\pm 13,59$	9,53 $\pm 13,29$	4,08 $\pm$ 6,95
14	0,95 $\pm 1,63$	0,11 $\pm 0,27$	0,87 $\pm 1,43$	0,46 $\pm$ 0,85	1,53 $\pm 2,70$	0,11 $\pm 0,27$	1,60 $\pm 2,70$	0,71 $\pm$ 0,78	5,93 $\pm 10,44$	1,30 $\pm 2,02$	4,03 $\pm$ 3,91	8,59 $\pm$ 1,58

Médias marcadas com letras minúsculas na mesma linha diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

T-1: sêmen submetido à renovação do meio diluidor a cada 6 dias.

T-2: sêmen submetido à renovação do meio diluidor após 12 dias.

A renovação do meio diluidor não teve efeito nem sobre o padrão de motilidade dos espermatozoides nem sobre a integridade de membranas espermáticas do sêmen seja avaliado na forma de *pools* ou de ejaculados individuais.

No presente trabalho, avaliou-se o efeito da renovação do meio diluidor sobre a qualidade do sêmen de seis cães, sendo o sêmen avaliado na forma de ejaculados individuais e agrupados em *pools*. A formação de *pools* de sêmen simplificou a manipulação do sêmen e pode em alguns casos viabilizar a realização de análises que não eram possíveis com ejaculados individuais em função do volume. Apesar disso, tanto os desvios-padrão quanto os coeficientes de variação dos resultados obtidos a partir de *pools* de sêmen foram semelhantes aos obtidos a partir de ejaculados individuais. Embora os ejaculados individuais e os *pools* de sêmen

tenham reagido de forma semelhante aos tratamentos de renovação do meio diluidor, os primeiros proporcionaram resultados mais claros e precisos, capazes de estabelecer diferenças entre tratamentos não identificadas nos *pools* de sêmen.

## 7.6 CONCLUSÃO

A formação de *pools* de sêmen simplificou sua manipulação principalmente no que diz respeito ao aumento do volume do material de trabalho, no entanto resultados obtidos a partir de ejaculados individuais mostraram diferenças entre tratamentos não identificadas nos *pools* de sêmen.

## 7.7 REFERÊNCIAS

Vide seção 11.

## 8 EXPERIMENTO 3: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM FRUTOSE SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CANINO RESFRIADO

### 8.1 RESUMO

Busca-se esclarecer o efeito da suplementação do meio diluidor Tris-Gema com 4mmol/L de frutose sobre a qualidade do sêmen canino resfriado. Sêmen de seis cães foi coletado na forma de *pools* (n=6), diluído, na proporção de 1:1 em meio Tris-Gema e centrifugado a 500g/10min. O *pellet* formado foi ressuspensionado em meio Tris-Gema até concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O sêmen foi então resfriado a taxa de 0,26 °C/min, entre 37 e 16 °C, e 0,08 °C/min, entre 16 e 8 °C e em seguida mantido em geladeira a 5 °C por 14 dias. No Tratamento 1 o meio diluidor foi suplementado a cada seis dias; e no Tratamento 2 após doze dias de resfriamento. O sêmen foi avaliado, a cada 48 horas quanto à motilidade espermática, utilizado o Sperm Class Analyser® (SCA), reatividade ao Teste Hiposmótico e integridade de membrana avaliada pela coloração com PI/CFDA. A suplementação do meio diluidor com 4mmol/L de frutose após seis dias de resfriamento, mas não aos doze dias melhorou a motilidade espermática e integridade de membranas da cabeça e acrossoma. A longevidade espermáticas não foi afetada pela suplementação do meio diluidor com frutose.

### 8.2 ABSTRACT

We evaluated the effect of fructose supplementation on medium Tris-Yolk over on chilled dog semen quality. Semen was collected from six dogs as *pools*, diluted in a 1:1 ratio in Tris-Yolk medium and centrifuged at 500g/10min. The *pellet* was then resuspended to final concentration of  $50 \times 10^6$  sperm/mL. Semen was cooled at rates of 0.26 °C/min between 37 and 16°C, and 0.08 °C/min from 16 to 8°C, and then kept in a refrigerator for 14 days. In Treatment 1 medium was supplemented every six days with 4mmol/L of fructose, and in Treatment 2 medium after twelve days. Cooled semen was evaluated every 48 hours for sperm motility, using the Sperm Class Analyser® (SCA), percentage of reactive sperm in hypotonic swelling teste, and percentage of intact sperm evaluated by PI/CFDA stain. Supplementation with fructose after six days of cooling, but not after twelve improved sperm motility and integrity of head and acrosoma membranes. Sperm longevity was not affected by medium supplementation.

### 8.3 INTRODUÇÃO

A maioria das reações que mantém o status funcional das células, bem como aquelas relacionadas à resistência a condições não-fisiológicas consomem energia. Apesar de o plasma seminal canino não conter quantidades significativas de açúcares como glicose, frutose, sorbitos ou manose, os espermatozoides dependem fortemente de fontes exógenas de energia para manter seu metabolismo quando preservados *in vitro* (Rigau et al., 2002; Rodriguez-Gil, 2006). Em espécies em que os espermatozoides precisam sobreviver no trato genital da fêmea por longos períodos, como o cão, a eficiência metabólica e a sobrevivência celular poderiam ser otimizadas pela formação de reservas intracelulares de energia. De fato o espermatozoide canino parece ser capaz de não só de desviar parte dos açúcares absorvidos para

vias anabólicas, como de sintetizar glicose a partir de substratos exógenos com três carbonos como o lactato, ou mesmo a partir de hexoses como a frutose (Rigau et al., 2002; Albarracín et al., 2004). Boa parte da glicose recém-sintetizada, bem como da glicose exógena absorvida parece ser armazenada na forma de glicogênio. (Albarracín et al., 2004; Rodriguez-Gil, 2006). Rigau et al. (2002) demonstraram que e a incubação de espermatozoides caninos em meios sem adição de açúcar provoca uma diminuição progressiva do conteúdo intracelular de glicogênio e da motilidade espermática e adição de açúcares, especialmente a frutose, diminui a taxa de queda destes parâmetros.

O presente trabalho visa avaliar o efeito da suplementação de frutose no meio diluidor sobre o período de sobrevivência do sêmen canino resfriado e a motilidade e integridade espermática.

#### 8.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis cães de raças diferentes, com idade entre três e cinco anos, provenientes de canil particular. Os animais foram alojados em canis individuais de 6m<sup>2</sup> composto de área coberta com abrigo e solário, sendo alimentado com ração comercial oferecida duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Foram selecionados cães com motilidade espermática acima de 70% e menos de 30% de espermatozoides morfologicamente anormais no ejaculado (Johnson et al., 2001). Antes do início do experimento os cães tiveram sua reserva espermática extra-gonadal esgotada (England, 1999). Sêmen dos seis cães foi coletado, no mesmo dia, e agrupado para formação de um *pool*. Esse procedimento foi repetido, com intervalo de 2 a 3 dias entre coletas, até a formação de seis *pools* (para maiores detalhes vide seção 5.2).

Imediatamente após a coleta o sêmen foi diluído, na proporção de 1:1 em meio Tris-Gema (Rota et al., 1995) previamente aquecido a 37°C, e centrifugado a 500 g/10min. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado ressuspenso em meio Tris-Gema até concentração final de 50 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. O sêmen foi então resfriado, em caixa de poliestireno contendo gelo reutilizável, à taxa de 0,26°C/min, entre 37 e 16°C, e 0,08°C/min, entre 16 e 8°C (para maiores detalhes vide seção 5.3). Após resfriado o sêmen foi mantido em geladeira a 5°C por 14 dias. Durante a conservação em geladeira, cada *pool* de sêmen foi dividido em dois tratamentos: no Tratamento 1 o meio diluidor foi suplementado com 4mmol/L de frutose a cada seis dias; e no Tratamento 2 o meio diluidor suplementado com 4mmol/L de frutose após 12 dias (para maiores detalhes vide seção 5.3).

O sêmen resfriado foi avaliado, a cada 48 horas quanto à motilidade espermática e integridade de membranas. Para avaliação da motilidade espermática foi utilizado o Sperm Class Analyser® (SCA) versão 4.0 da Microptic® (Barcelona, Espanha). As amostras resfriadas foram aquecidas em banho-maria a 37°C por 2 min e, em seguida, uma gota de 5µL foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C e acondicionada ao SCA. O *setup* foi ajustado para os padrões de movimentação do sêmen de canino pré-

existentes. Os espermatozoides foram classificados nas seguintes categorias: Móveis Rápidos Progressivos, aqueles com velocidade curvilinear (VCL) maior que 100 micron/s e retilinearidade (STR) maior que 75; Móveis Lentos Progressivos, aqueles com VCL entre 65 e 100 micron/s e STR maior que 75; Móveis Não Progressivos, aqueles com VCL maior que 10 micron/s e STR menor que 75; e Imóveis, aqueles com VCL menor que 10 micron/s (para maiores detalhes vide seção 5.4.2).

A integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides foi avaliada pelo Teste Hiposmótico (HO) de acordo com a técnica descrita por Kumi-Diaka (1993) utilizando solução de 60mosmol de frutose em água destilada. A porcentagem de células reativas ao Teste Hiposmótico foi corrigida segundo a fórmula proposta por Melo e Henry (1999) (para maiores detalhes vide seção 5.4.3).

A integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça e do acrossoma dos espermatozoides foi avaliada pela técnica da fluorescência, adotando-se os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP), segundo o protocolo proposto por Harrison & Vickers (1990), modificado por Zúccari (1998). Os espermatozoides foram classificados como: Íntegros (completamente marcados pelo CFDA); Lesados (completamente marcados pelo PI); e Semi-lesados (marcados tanto pelo CFDA quanto pelo PI) (para maiores detalhes vide seção 5.4.4).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com parcelas subdivididas, sendo o *pool* de sêmen o bloco, o tratamento a parcela e o dia a subparcela. As variáveis apresentaram distribuição normal, e foram comparadas pela ANOVA utilizando o teste Tukey-Kramer com nível de significância de 5%, no programa SAS versão 2008.

#### 8.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando a Tab. 8 verifica-se que, a partir do Dia 6, quando foi realizado o primeiro procedimento de suplementação do meio diluidor com frutose, todos os valores médios de motilidade progressiva e motilidade total foram superiores no Tratamento 1, quando

comparados ao Tratamento 2. No entanto, em função da grande variação individual na motilidade do sêmen resfriado, que acarretou altos desvios-padrão, foi possível estabelecer diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros de motilidade espermática

progressiva e total apenas no Dia 10, quando os valores foram estatisticamente superiores no Tratamento 1. A suplementação do meio com frutose aos 12 dias de resfriamento, não teve efeito perceptível sobre a motilidade ou longevidade espermática.

Tabela 8- Média  $\pm$  desvio padrão de porcentagem de espermatozoides rápidos progressivos, lentos progressivos, progressivos totais, móveis não progressivos, móveis totais e imóveis, de seis pools de sêmen canino resfriados por 14 dias.

Dias		0	2	4	6	8	10	12	14
<b>Rápidos Progressivos</b>	T1	41,52 $\pm$ 12,29	53,92 $\pm$ 5,96	44,87 $\pm$ 11,93	45,07 $\pm$ 9,25	37,05 $\pm$ 9,15	20,98 <sup>A</sup> $\pm$ 8,44	7,57 $\pm$ 8,35	0,00
		41,52 $\pm$ 12,29	44,94 $\pm$ 5,96	44,87 $\pm$ 11,93	44,53 $\pm$ 7,23	34,08 $\pm$ 7,35	11,03 <sup>B</sup> $\pm$ 8,42	5,17 $\pm$ 5,92	0,00
	T2	32,19 $\pm$ 10,84	22,09 $\pm$ 11,02	26,25 $\pm$ 6,38	15,86 $\pm$ 6,10	15,89 $\pm$ 5,83	12,35 <sup>A</sup> $\pm$ 4,47	5,30 $\pm$ 6,00	0,00
		32,19 $\pm$ 10,84	22,09 $\pm$ 11,02	26,25 $\pm$ 6,38	15,72 $\pm$ 2,80	15,32 $\pm$ 5,42	6,57 <sup>B</sup> $\pm$ 4,92	4,77 $\pm$ 5,35	0,00
<b>Progressivos Totais</b>	T1	73,71 $\pm$ 9,75	67,03 $\pm$ 33,09	71,11 $\pm$ 13,05	60,92 $\pm$ 10,00	52,94 $\pm$ 12,82	33,33 <sup>A</sup> $\pm$ 9,41	12,87 $\pm$ 14,27	0,00
		73,71 $\pm$ 9,75	67,03 $\pm$ 33,09	71,11 $\pm$ 13,05	60,25 $\pm$ 9,51	49,40 $\pm$ 13,09	17,60 <sup>B</sup> $\pm$ 12,87	9,95 $\pm$ 11,02	0,00
	T2	13,08 $\pm$ 3,36	5,63 $\pm$ 4,18	15,65 $\pm$ 8,87	11,90 $\pm$ 4,28	10,93 $\pm$ 3,87	11,84 $\pm$ 3,03	6,31 $\pm$ 7,20	0,00
		13,08 $\pm$ 3,36	5,63 $\pm$ 4,18	15,65 $\pm$ 8,87	10,06 $\pm$ 3,29	10,01 $\pm$ 2,86	8,52 $\pm$ 5,05	9,12 $\pm$ 10,61	0,00
<b>Móveis Totais</b>	T1	86,80 $\pm$ 7,78	72,66 $\pm$ 35,64	86,76 $\pm$ 7,54	72,82 $\pm$ 9,74	63,87 $\pm$ 13,27	45,18 <sup>A</sup> $\pm$ 10,27	19,18 $\pm$ 21,20	0,00
		86,80 $\pm$ 7,78	72,66 $\pm$ 35,64	86,76 $\pm$ 7,54	70,31 $\pm$ 6,39	59,41 $\pm$ 13,01	26,13 <sup>B</sup> $\pm$ 16,61	19,06 21,44	0,00
	T2	86,80 $\pm$ 7,78	72,66 $\pm$ 35,64	86,76 $\pm$ 7,54	70,31 $\pm$ 6,39	59,41 $\pm$ 13,01	26,13 <sup>B</sup> $\pm$ 16,61	19,06 21,44	0,00
		86,80 $\pm$ 7,78	72,66 $\pm$ 35,64	86,76 $\pm$ 7,54	70,31 $\pm$ 6,39	59,41 $\pm$ 13,01	26,13 <sup>B</sup> $\pm$ 16,61	19,06 21,44	0,00

Médias marcadas com letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

T-1: meio diluidor suplementado com 4mmol/L de frutose a cada seis dias

T-2: meio diluidor suplementado com 4mmol/L de frutose após doze dias

O consumo de açúcar nas primeiras 24 horas de armazenamento do sêmen canino resfriado é grande, no entanto, a partir do segundo dia de resfriamento esse consumo cai de forma que, durante o período de sobrevivência dos espermatozoides resfriados, apenas uma pequena porção do açúcar disponível no meio é consumida. Ainda, a curva de queda da motilidade espermática durante o resfriamento não acompanha a curva de consumo de açúcar do meio (Ponglowhapan et al., 2004; Vestegen

et al., 2005), de forma que a escassez completa de açúcares não pareça ser responsável pela queda da motilidade do sêmen resfriado. Apesar disso, meios diluidores contendo altas concentrações de açúcar preservam melhor motilidade durante a conservação do sêmen resfriado por longos períodos (Ponglowhapan et al. 2004).

As variações na integridade de membranas espermáticas, durante os 14 dias de experimento, estão demonstradas na Tab. 9, que

traz a média de espermatozoides reativos ao Teste Hiposmótico, e média dos espermatozoides íntegros, lesados e semi-lesados segundo coloração com PI/CFAD. Observa-se que os valores médios dos parâmetros de integridade de membrana oscilaram, sendo ora maiores no Tratamento 1

ora no Tratamento 2. No entanto, houve diferença significativa apenas nos parâmetros de porcentagem média de espermatozoides íntegros e lesados, no Dia 6, apontando melhor integridade de membranas no sêmen suplementado periodicamente com frutose (Tratamento 1).

Tabela 9 - Média  $\pm$  desvio padrão de porcentagem de espermatozoides íntegros, semi-lesados e lesados, avaliados pela coloração com PI/CFDA, média de porcentagem de espermatozoides reativos ao Teste Hiposmótico, de seis *pools* de sêmen canino resfriados por 14 dias.

Dias		0	2	4	6	8	10	12	14
Lesados	T1	9,83 $\pm$ 5,85	15,17 $\pm$ 12,67	20,33 $\pm$ 9,29	16,33 <sup>A</sup> $\pm$ 4,13	24,00 $\pm$ 5,55	24,67 $\pm$ 5,61	21,17 $\pm$ 6,82	31,00 $\pm$ 9,44
	T2	9,83 $\pm$ 5,85	15,17 $\pm$ 12,67	20,33 $\pm$ 9,29	28,33 <sup>B</sup> $\pm$ 21,34	22,17 $\pm$ 6,11	22,50 $\pm$ 9,59	22,50 $\pm$ 7,79	24,33 $\pm$ 5,65
Semi-lesados	T1	7,50 $\pm$ 3,94	8,00 $\pm$ 12,77	9,00 $\pm$ 6,75	11,33 $\pm$ 5,61	14,33 $\pm$ 4,80	11,83 $\pm$ 7,08	10,17 $\pm$ 5,12	12,50 $\pm$ 5,82
	T2	7,50 $\pm$ 3,94	8,00 $\pm$ 12,77	9,00 $\pm$ 6,75	17,00 $\pm$ 4,82	16,67 $\pm$ 10,13	11,83 $\pm$ 3,66	13,33 $\pm$ 6,47	14,67 $\pm$ 9,03
Íntegros	T1	82,67 $\pm$ 8,19	76,83 $\pm$ 25,28	72,17 $\pm$ 17,36	72,33 <sup>A</sup> $\pm$ 7,94	61,67 $\pm$ 8,52	63,50 $\pm$ 8,43	68,67 $\pm$ 9,18	56,50 $\pm$ 12,53
	T2	82,67 $\pm$ 8,19	76,83 $\pm$ 25,28	72,17 $\pm$ 17,36	54,50 <sup>B</sup> $\pm$ 22,52	61,17 $\pm$ 14,93	62,83 $\pm$ 16,87	64,17 $\pm$ 12,67	59,33 $\pm$ 15,81
Reativos - HO	T1	84,33 $\pm$ 14,24	77,00 $\pm$ 7,51	74,17 $\pm$ 9,41	68,33 $\pm$ 6,06	58,33 $\pm$ 8,04	53,33 $\pm$ 6,98	47,00 $\pm$ 10,16	50,83 $\pm$ 15,17
	T2	84,33 $\pm$ 14,24	77,00 $\pm$ 7,51	74,17 $\pm$ 9,41	65,33 $\pm$ 11,71	59,83 $\pm$ 5,98	55,67 $\pm$ 9,40	46,50 $\pm$ 8,50	49,17 $\pm$ 10,82

Médias marcadas com letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

T-1: meio diluidor suplementado com 4mmol/L de frutose a cada seis dias

T-2: meio diluidor suplementado com 4mmol/L de frutose após doze dias

Neste trabalho, a suplementação periódica do meio diluidor com 4mmol/L de frutose melhorou a motilidade espermática e integridade das membranas da cabeça e acrossoma, no entanto nem a suplementação periódica nem a suplementação após doze dias tiveram efeito sobre a longevidade do sêmen canino resfriado. Rigau et al. (2002) avaliando o efeito da adição de glicose e frutose ao meio diluidor para preservação do sêmen a temperatura ambiente, verificaram que a suplementação com açúcares, em concentrações variando de 1 a 10mmol/L, teve efeito benéfico, dose-dependente, sobre a motilidade, viabilidade espermática e integridade de acrossoma. No entanto concentrações de açúcar

superiores a 10mmol/L tiveram efeitos deletérios sobre a qualidade seminal. Já Ponglowhapan et al. (2004) estudando o efeito da suplementação de glicose e frutose no meio diluidor para resfriamento de sêmen canino verificaram que meios contendo 70mM de açúcares preservaram melhor a motilidade espermática que meios com 10mM.

Mais do que atuar como fonte de energia, as hexoses têm potencial de influenciar diversos processos celulares, que vão desde a taxa de fosforização de proteínas até o inteiro processo de capacitação espermática (Albarracin et al., 2004; Bucci et al., 2010). A adição de frutose ao meio diluidor é capaz de incrementar o

metabolismo espermático, aumentando a taxa de consumo de ATP e levando a um padrão de motilidade espermática mais rápida e linear (Rigau et al., 2002). Se por um lado a aceleração do metabolismo causado pela adição de açúcar ao meio leva a um incremento da motilidade, da integridade, e possivelmente da capacidade fecundante dos espermatozoides, por outro, tendo em vista que a essência da criopreservação do sêmen é reduzir o metabolismo celular e assim aumentar sua longevidade, a suplementação com hexoses parece uma estratégia contraditória no que diz respeito ao aumento da longevidade do sêmen resfriado, um desafio metabólico a ser esclarecido no contexto da relação entre suprir o espermatozoide de nutrientes e, de forma aparentemente contraditória, criopreserva-lo

reduzindo ou paralizando temporariamente seu metabolismo.

## 8.6 CONCLUSÃO

A suplementação do meio diluidor Tris-gema com 4mmol/L de frutose no sexto dia de resfriamento melhorou a motilidade e a integridade de membranas da cabeça e acrossoma dos espermatozoides resfriados, já a suplementação no 12º dia não influenciou qualidade do sêmen. A longevidade espermática não foi influenciada pela suplementação do meio diluidor com frutose.

## 8.7 REFERÊNCIAS

Vide seção 11.

## 9 RESULTADOS COMPLEMENTARES: PARÂMETROS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DO SÊMEN CANINO FRESCO E A INFLUÊNCIA DE UM CURTO INTERVALO ENTRE COLETAS SOBRE A QUALIDADE DO EJACULADO

### 9.1 RESUMO

Avaliar parâmetros quantitativos e qualitativos de ejaculados caninos coletados ao longo de um mês, bem como o efeito de um curto intervalo entre coletas sobre a qualidade do sêmen. Para tanto foram coletados de 84 ejaculados, de seis cães com idade entre 2 e 5 anos. Foram obtidos dois ejaculados por cão a cada dia de coleta, com intervalo de 2-3 horas entre coletas no mesmo dia, e 2-3 dias entre coletas em dias diferentes. Foi verificada variação individual de até 10 vezes no volume do ejaculado (1 a 10,5 mL), concentração de espermatozoides por mL de sêmen (25 a 485 x 10<sup>6</sup> espermatozoides / mL de sêmen) e concentração total de espermatozoides no ejaculado (152 a 1690 x 10<sup>6</sup> espermatozoides totais no ejaculado). Percebeu-se também oscilações na média destes parâmetros ao longo do período experimental. A motilidade e o vigor espermático apresentaram variação individual de cerca de 30% (70 a 95% e 3 a 4,5 respectivamente). Os valores médios de motilidade espermática variaram ao longo do tempo, sendo os menores valores observados na primeira semana de coleta. Os valores médios de volume do ejaculado, concentração espermática por mL de sêmen e concentração total de espermatozoides no ejaculado foram, na grande maioria, menores na segunda coleta. Entretanto, em função dos altos desvios-padrão e altos coeficientes de variação não foi possível estabelecer diferenças estatisticamente significativas entre as médias da primeira e segunda coleta. A motilidade e o vigor espermático mantiveram-se constantes entre as coletas consecutivas. O curto intervalo de coletas não alterou os parâmetros quantitativos ou qualitativos avaliados no sêmen canino fresco.

### 9.2 ABSTRACT

This work evaluates quantitative and qualitative parameters of dog semen collected over a month period as well as the effect of a short interval between ejaculates on semen quality. Eighty-four ejaculates were collected from six dogs, 2 to 5 years old. Semen was collected twice a day, on a 3 hours maximum interval between collections on the same day. A 10 fold individual variability was record on semen volume (1 to 10,5mL), sperm concentration per mL of semen (25 to 485 x 10<sup>6</sup>sptz/mL) and sperm concentration per ejaculated (152 to 1690 x 10<sup>6</sup>sptz/ejaculate). Along with individual variability there were also oscillations in these parameters over time. Sperm motility show a 30% individual variability (70 to 95%). The mean values of sperm motility varied over time, with the lowest values observed in the first week. Mean ejaculated volume, sperm concentration per mL of semen and total sperm concentration were, in most cases, lower in the second collection. However, because of the high standard derivation and high coefficients of variation it was not possible to establish statistically significant differences between the first and second collections The short interval between collections did not affect the qualitative or quantitative parameters evaluated in fresh dog semen.

### 9.3 INTRODUÇÃO

A coleta de sêmen é um procedimento rotineiro na clínica reprodutiva de cães. Suas indicações incluem, além da criopreservação do sêmen, a inseminação artificial com sêmen fresco e exame clínico-andrológico (Johnston et al., 2001; Kutzler 2005). Um contratempo muitas vezes experimentado nos casos de coleta de sêmen para criopreservação, principalmente em se tratando de raças de pequeno porte, é que o baixo número final de doses inseminantes

obtidas após a criopreservação. Em alguns casos de coletas para congelamento de sêmen, em função do tamanho do animal, do total de espermatozoides ejaculados, e da queda da viabilidade espermática após o congelamento, o rendimento final chega e ser menor que uma dose inseminante por ejaculado processado. Por este motivo tem-se investigado a possibilidade de efetuar múltiplas coletas de sêmen de um mesmo cão, com intervalos curtos entre coletas, no intuito de criopreservar simultaneamente

mais de ejaculado (England, 1999; Kutzler 2005).

O estabelecimento de padrões seminais precisos para a avaliação andrológica do cão tem se mostrado difícil, em função tanto da grande variabilidade de raças, quanto pela existência de poucos estudos avaliando sistematicamente o ejaculado de um grande número de cães. Em termos qualitativos consideram-se aceitáveis os ejaculados que apresentem motilidade espermática superior a 70%, com mais de 30% de espermatozoides morfolologicamente normais (Threlfall, 2003). Já em termos quantitativos, os parâmetros de concentração espermática, volume do ejaculado, e total de espermatozoides ejaculados podem variar em até 10x em função do tamanho do animal e dos seus testículos (Threlfall, 2003). A grande amplitude de valores considerados normais, associada à grande variação individual e racial pode dificultar, em casos individuais, uma avaliação andrológica objetiva e precisa.

O presente trabalho tem o objetivo de descrever parâmetros qualitativos e quantitativos de ejaculados caninos coletados a cada 2-3 dias ao longo de um mês, bem como a influência de um curto intervalo entre coletas sobre a qualidade seminal.

#### 9.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis cães, quatro da raça Labrador e dois da raça Shar Pei, com idade entre três e cinco anos, provenientes de canil particular. Os animais foram alojados em canis individuais de 6 m<sup>2</sup> composto de área coberta com abrigo e solário, sendo alimentado com ração comercial oferecida duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

Foram selecionados para o experimento cães com motilidade espermática acima de 70% e menos de 30% de espermatozoides morfolologicamente anormais no ejaculado (Johnson et al., 2001). Antes do início do experimento os cães tiveram sua reserva espermática extra-gonadal esgotada (England, 1999). Para o experimento foi realizado, para cada cão, quatro coletas semanais, duas às segundas-feiras e duas às quintas-feiras, durante um mês, totalizando 84 coletas. As coletas realizadas no mesmo dia tiveram intervalo de aproximadamente três horas entre si. Foram

realizadas quatro coletas semanais, duas às segundas-feiras e duas às quintas-feiras por um período de um mês, totalizando 84 coletas. As coletas realizadas no mesmo dia tiveram intervalo médio três horas entre si.

A segunda fração do ejaculado, identificada pela coloração, foi coletada pelo método de manipulação digital do pênis (Linde-Forsberg, 2001), com auxílio de saco plástico, acoplado a um tubo tipo *falcon*. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado, quanto à motilidade e vigor espermáticos, em microscopia de luz em aumento de 200 e 400x, utilizando 10µl de sêmen fresco preparados entre lamina e lamínula previamente aquecidos a 37°C. Dois observadores avaliaram as amostras quanto a motilidade, expressas em porcentagem (0-100) e vigor espermático, expresso numa escala de 0 (imobilidade) a 5 (rápida mobilidade) (Hafez e Hafez, 2004).

O volume da segunda fração do ejaculado, foi mensurado por meio da graduação do tubo coletor tipo *falcon* e a concentração de espermatozoides por mL foi determinada através de diluição do sêmen em solução de formol-salina tamponada na taxa de 1:100 e posterior contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer sob microscopia óptica em aumento de 400X. (Hafez e Hafez, 2004). A concentração total de espermatozoides no ejaculado foi obtida multiplicando-se a concentração de espermatozoides por mL pelo volume da segunda fração do ejaculado (para maiores detalhes vide seção 5.4.1).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com parcelas subdivididas, sendo o animal o bloco, a ordem da coleta (1<sup>a</sup> ou 2<sup>a</sup> coleta do dia) a parcela e o dia a subparcela. As variáveis apresentaram distribuição normal, e foram comparadas pela ANOVA utilizando o teste Tukey-Kramer com nível de significância de 5%, no programa SAS versão 2008.

#### 9.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros quantitativos seminais variaram numa amplitude de mais de 10 vezes entre diferentes coletas de um mesmo indivíduo. O volume da segunda fração do ejaculado variou entre 1 e 10,5 mL, enquanto a concentração de espermatozoides por mL variou de 25 a 485 x 10<sup>6</sup> e a concentração total de espermatozoides

no ejaculado esteve entre 152 e 1690 x 10<sup>6</sup> espermatozoides totais . Foi possível perceber também oscilações nos valores médios de sêmen, e concentração total de espermatozoides no ejaculado ao longo do tempo.

O volume do ejaculado e a concentração espermática por mL de sêmen podem ser influenciados pelas circunstâncias da coleta, que levem à presença de maior ou menor volume de fluido prostático associado à fração espermática. Estas oscilações são de difícil interpretação e muitas vezes tem pouco significado como informação isolada (Amann, 1981). Já a concentração total de espermatozoides no ejaculado, embora possa sofrer influência da idade, frequência de ejaculação e libido, é fortemente associada ao tamanho do testículo e à sua produção espermática diária. Cães sexualmente maduros, cujo desenvolvimento testicular e espermatogênico é completo, quando submetidos a coleta de sêmen periódica, respeitando o intervalo de 48h entre coletas para completa reposição da reserva espermática extragonadal, em teoria devem apresentar concentração total de espermatozoides no ejaculado constante (Amann, 1981; Olar et al., 1983; Kutzer, 2005). Os cães que participaram deste trabalho apresentavam idade, massa corporal e testicular próximas, sendo todos sexualmente maduros, condicionados para coleta de sêmen e submetidos a correto manejo reprodutivo. Mesmo assim, identificou-se, para todos os parâmetros seminais acima citados, variação entre coletas de um mesmo indivíduo, bem como oscilações nos valores médios ao longo do tempo. Embora a libido seja um atributo de difícil quantificação, e tida como constante em animais condicionados à coleta de sêmen (Olar et al., 1983; Threlfall, 2003; Kutzer, 2005), foram percebidas variações na libido dos cães ao longo do tempo, o que possivelmente influenciou a concentração total de espermatozoides no ejaculado.

Os valores individuais de motilidade e o vigor espermático apresentaram variações mais discretas, de cerca de 30% entre coletas, oscilando entre 70 a 95% e 3 a 4,5 respectivamente. Já os valores médios variaram significativamente ao longo do tempo, sendo os menores valores médios de motilidade espermática observados durante a primeira semana de coleta (dias 1 e 2).

volume da segunda fração do ejaculado, concentração de espermatozoides por mL de

O ejaculado é um fluido complexo, com componentes originários das glândulas acessórias, testículos e epidídimos. Todos estes componentes podem, em maior ou menor grau, influenciar a motilidade espermática (Amann, 1981; Olar et al., 1983; Threlfall, 2003; Kutzer, 2005). Mesmo tendo sido feito o adequado esgotamento da reserva espermática extragonadal antes do início do experimento, é possível que o aumento da frequência de coleta de sêmen durante o período experimental tenha influenciado a composição do sêmen ou mesmo as características das populações de espermatozoides do ejaculado de forma a incrementar a motilidade espermática a partir da segunda semana de coleta.

Observando a Tab. 10 percebe-se que os valores médios de volume da segunda fração do ejaculado, concentração espermática por mL de sêmen e concentração total de espermatozoides no ejaculado foram, na grande maioria, menores na segunda coleta. Entretanto, em função da grande variação individual, que levou a altos desvios-padrão não foi possível estabelecer diferenças estatisticamente significativas entre as médias da primeira e segunda coleta. Embora tenha sido percebida queda subjetiva nos parâmetros quantitativos no sêmen proveniente na segunda coleta, o mesmo não foi observado para os parâmetros qualitativos, uma vez que a motilidade e o vigor espermático mantiveram-se constantes entre as coletas consecutivas. Engalnd (1999) avaliou a qualidade do sêmen de 65 cães, de raças distintas, obtidos em dois ejaculados com intervalo de uma hora, verificando, no segundo ejaculado, queda do volume, da concentração de espermatozoides por mL de sêmen e da concentração total de espermatozoides. Ainda, descreveu que, embora tenha havido queda nos parâmetros quantitativos do sêmen, não houve alteração na motilidade e viabilidade espermática média entre a primeira e segunda coleta. Entretanto, não encontrou diferença na libido dos cães entre as coletas. No presente trabalho, observações durante as coletas sinalizam diminuição ocasional na libido durante a segunda coleta, embora a adaptação ao procedimento de coletas consecutivas e, conseqüentemente, a libido demonstrada tenham sido muito particulares de

cada indivíduo, sendo que em alguns casos tanto o volume da segunda fração do ejaculado,

quanto a concentração total de espermatozoides chegou a ser maior no segundo ejaculado.

Tabela 10- Média  $\pm$  Desvio Padrão do volume da segunda fração do ejaculado, concentração de espermatozoides (sptz) por mL de sêmen, concentração total de espermatozoides no ejaculado, vigor e motilidade espermáticos médios, de 84 ejaculados, coletados de seis cães, dois ejaculados a cada dia de coleta, com intervalo máximo de 2-3 hora entre coletas no mesmo dia (1ª e 2ª coleta), e 2-3 dias entre coletas em dias diferentes.

Coletas	Volume da Segunda Fração do Ejaculado		Concentração de sptz/mL x 10 <sup>6</sup>		Concentração Total de Espermatozoides		Vigor Espermático		Motilidade Espermático	
	Média 1ª Coleta	Média 2ª Coleta	Média 1ª Coleta	Média 2ª Coleta	Média 1ª-Coleta	Média 2ª Coleta	Média 1ª Coleta	Média 2ª Coleta	Média 1ª Coleta	Média 2ª Coleta
1	3,92 $\pm$ 1,83	3,08 $\pm$ 2,04	159,92 $\pm$ 97,96	183,17 $\pm$ 121,57	517,92 $\pm$ 231,80	394,83 $\pm$ 257,60	4,00 $\pm$ 0,71	3,83 $\pm$ 0,52	83,33 $\pm$ 8,76	81,67 $\pm$ 8,16
2	4,17 $\pm$ 0,88	4,33 $\pm$ 2,16	140,83 $\pm$ 33,12	146,83 $\pm$ 99,19	582,71 $\pm$ 167,64	571,50 $\pm$ 356,01	3,75 $\pm$ 0,42	3,92 $\pm$ 0,49	82,50 $\pm$ 8,22	83,33 $\pm$ 8,76
3	5,08 $\pm$ 2,52	4,50 $\pm$ 1,58	117,33 $\pm$ 21,74	84,60 $\pm$ 22,78	558,25 $\pm$ 176,69	390,70 $\pm$ 220,21	3,92 $\pm$ 0,49	3,80 $\pm$ 0,57	85,00 $\pm$ 8,94	89,00 $\pm$ 6,52
4	3,80 $\pm$ 1,44	3,70 $\pm$ 1,35	233,20 $\pm$ 130,46	192,00 $\pm$ 88,74	643,92 $\pm$ 375,15	606,08 $\pm$ 492,09	4,30 $\pm$ 0,45	4,10 $\pm$ 0,22	89,00 $\pm$ 5,48	89,00 $\pm$ 5,48
5	4,10 $\pm$ 2,58	3,80 $\pm$ 1,44	158,60 $\pm$ 121,39	157,60 $\pm$ 155,86	424,08 $\pm$ 278,56	482,92 $\pm$ 514,25	4,28 $\pm$ 0,94	4,20 $\pm$ 0,45	89,00 $\pm$ 5,48	90,00 $\pm$ 3,54
6	4,60 $\pm$ 2,33	3,88 $\pm$ 0,85	134,00 $\pm$ 100,96	155,75 $\pm$ 220,01	481,33 $\pm$ 487,18	363,75 $\pm$ 657,15	3,80 $\pm$ 0,45	4,25 $\pm$ 0,50	87,00 $\pm$ 6,71	88,75 $\pm$ 6,29
7	5,00 $\pm$ 3,32	5,75 $\pm$ 2,87	222,80 $\pm$ 142,91	150,75 $\pm$ 115,58	670,92 $\pm$ 522,09	452,50 $\pm$ 480,95	4,50 $\pm$ 0,35	4,50 $\pm$ 0,58	87,00 $\pm$ 6,71	85,00 $\pm$ 5,77

É possível que a qualidade do ejaculado canino não sofra alterações significativas em função curto intervalo entre coletas ou mesmo com o passar do tempo, numa escala de meses. Já os parâmetros quantitativos de volume do ejaculado e concentração espermática sofreram oscilações subjetivas tanto entre coletas quanto ao longo do tempo. Fatores relacionados à adaptação ao procedimento de coleta e libido parecem exercer influência maior do que a inicialmente esperada sobre os parâmetros quantitativos seminais, sendo, neste experimento, observada marcante variação individual na libido e na capacidade adaptativa dos animais.

## 9.6 CONCLUSÃO

Observou-se variação de até 10 vezes nos parâmetros quantitativos seminais entre coletas de um mesmo indivíduo, enquanto os parâmetros qualitativos apresentaram variação de cerca do 30%. Os valores médios de motilidade espermática variaram ao longo do tempo, sendo os menores observados na primeira semana de coleta. O curto intervalo de coletas não alterou os parâmetros quantitativos ou qualitativos avaliados no sêmen canino fresco.

## 9.7 REFERÊNCIAS

Vide seção 11.

## 10 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nesta tese buscou-se investigar alguns dos fatores que influenciam a qualidade e longevidade do sêmen resfriado, bem como duas alternativas para, através da manipulação do meio diluidor, melhor preservação dos espermatozoides sob refrigeração.

No Experimento 1 avaliou-se o efeito da renovação do meio diluidor Tris-Gema, seja periódica, a cada 6 dias, seja após 12 dias de resfriamento sobre a qualidade do sêmen canino resfriado. O sêmen foi capaz de manter constantes a motilidade espermática e a integridade de membranas da cabeça e acrossoma nos primeiros seis e quatro dias de resfriamento respectivamente. A renovação do meio diluidor manteve constante os parâmetros de motilidade espermática, enquanto a centrifugação e ressuspensão no meio original foi associada a queda da motilidade. A renovação do meio diluidor não influenciou a integridade das membranas espermáticas no sêmen resfriado.

No experimento 2 comparou-se os dados obtidos a partir de ejaculados individuais e *pools* de sêmen submetidos a dois tratamentos de renovação do meio diluidor. A formação de *pools* de sêmen simplificou sua manipulação, principalmente no que diz respeito ao aumento do volume do material de trabalho, no entanto resultados obtidos a partir de ejaculados individuais mostraram diferenças entre tratamentos não identificadas nos *pools* de sêmen.

No Experimento 3, avaliou-se o efeito da suplementação do meio com 4mmol frutose sobre a qualidade do sêmen resfriado. Verificou-se que a suplementação do meio diluidor com frutose após seis dias de resfriamento, mas não após doze dias, melhorou a motilidade e a integridade de membranas da cabeça e acrossoma dos espermatozoides resfriados. A longevidade espermática não foi influenciada pela suplementação do meio diluidor com frutose.

Dada a importância da qualidade do sêmen fresco no sucesso da criopreservação, e a

escassez de dados sistemáticos sobre a qualidade do ejaculado canino e sua variação ao longo do tempo, nos Resultados Complementares, avaliou-se alguns parâmetros qualitativos e quantitativos do sêmen canino fresco, bem como o efeito de um curto intervalo entre coletas na qualidade do ejaculado. Os parâmetros quantitativos seminais de volume do ejaculado, concentração de espermatozoides por mL de sêmen e concentração total de espermatozoides no ejaculado variaram em até 10 vezes entre coletas de um mesmo indivíduo, e na média ao longo do tempo. Já os parâmetros qualitativos de motilidade e o vigor espermático variaram de forma mais discretas, em cerca de 30% entre coletas, e também ao longo do tempo, sendo os menores valores médios de motilidade observados na primeira semana de coleta. O curto intervalo entre coletas não alterou os parâmetros quantitativos ou qualitativos avaliados no sêmen fresco.

Apesar dos avanços até agora, incluindo estes resultados, os desafios para compreender e manipular os mecanismos fisiológicos do sêmen do cão ainda estão longe de serem suplantados. Pesquisas com cães tem como desafios a variedade de raças, a baixa seleção para fertilidade, a variedade de repostas individuais, os hábitos e fisiologia reprodutiva da espécie. Quanto maior o conhecimento da fisiologia reprodutiva do macho, desde a espermatogênese até a fertilização, maiores as chances de atendermos a duas vertentes da reprodução do cão: por um lado a demanda de proprietários por um aumento da eficiência dos reprodutores, e por outro a demanda da sociedade para um controle humanitário da população de cães sem domicílio. Da mesma forma, o conhecimento detalhado da fisiologia das células espermáticas, desde sua formação passando pelas alterações físico-metabólicas que levam até a fusão dos pro-núcleos e o início da embriogênese, não só possibilitam avanços na área de criopreservação do sêmen e inseminação artificial como pode melhorar a compreensão e o tratamento de disfunções reprodutivas.

## 11 REFERÊNCIAS

- ALBARRACIN, J. L.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; BALLESTER, J.; et al. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of 'In vitro' capacitation of dog sperm in a medium without glucose. *Biol. Rep.*, v.71, p.1437-1445, 2004.
- ALBERTS, B.; BRAY, C.; LEWIS, J. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>a</sup> ed. New York: Garland Scie. Publishing, 2002.1400p.
- AMANN, R. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Andro.*, v.2, p.37-58, 1981.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equi. Vet. Scie.*, v.7, p.145-173, 1987.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriog.*, v.61, p.895-907, 2004.
- BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. Publicado online, em 09/2010, DOI 10.4061/2011/686137. Acesso em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2943128/>, em novembro de 2011.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Scie.*, v.89, p.65-75, 2005.
- BARTLETT, F.D.; VAN DEMARK, N.L. Effect of diluent composition on survival and fertility of bovine spermatozoa stored in carbonate diluents. *J. Dai. Scie.*, v.45, p.360-362, 1962.
- BECCAGLIA, M.; ANASTASI, P.; CHIGIONI, S., et al. Tris-Lecithin extender supplemented with antioxidant for chilling of canine semen. *Reprod. Dome. Anim.*, v.44 (Suppl. 2), p.345-349, 2009.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and Milk. *Molec. Reprod.Devel.*, v.73, p.1338-1344, 2006.
- BOUSSEAU, S.; BRILLARD; J. P.; MARQUANT, L. E; GUIENNE, B.; et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based extender. *Theriog.*, v.50, p.699-706, 1998.
- BOUCHARD, G. F.; MORRIS, J. K.; SIKES, J. D., et al. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriog.*, v.34, p.147-157, 1990.
- BUCCI, D.; ISANI, G.; SPINACI, M.; TAMANINI, C.; MARI, G.; ZAMBELLI, D.; GALEATI, G. Comparative immunolocalization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in boar, stallion and dog spermatozoa. *Reprod. Dome. Anim.*, v.45, p.315-322, 2010.
- CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; SILVA, E. C.; et al. Egg yolk and LDL: possibilities for artificial insemination in equines. *Rev. Med. Vet. Zoot. Córdo.*, v.13, p. 1514-1521, 2008.
- CHIRINÉA, V. H.; MARTINS, M. I. M.; SOUZA, F. F. et al. Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de congelação de sêmen de cães. *Revi. Bras. Reprod.Anim.*, v.27, n.3, p.361-363, 2003.
- CHRISTENSEN, B. W.; ASA, C. S.; WANG, C.; et al. Effect of semen collection method on sperm motility of gray wolves (*Canis lupus*) and domestic dog (*C. l. familiaris*). *Theriog.*, v.76, p.975-980, 2011.
- COOKSON, A. D.; THOMAS, A. N.; FOULKES, J. A. Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa. *J. Reprod.Fert.*, v.70, n.2, p.599-604, 1984.
- CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D. Centrifugation effects on canine semen quality. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, n.3, p.306-308, 1999.

- DAVIS, M. J.; PINTO, C. R.; KOZINSK, D. M.; et al. Detection of reactive oxygen species in canine semen. *Theriog.*, v.68, p.492-518, 2007.
- EILTS, B. E. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriog.*, v.64, p.685-691, 2005.
- ENGLAND, G. C. W. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriog.*, v.52, p.981-986, 1999.
- ENGLAND, G. C. W., PONZIO, P. Comparisons of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriog.*, v.46, p.165-171, 1996.
- ENGLAND, G. C. W.; PHILLIPS, L.; FREEMAN, S. L. Heritability of semen characteristics in dogs. *Theriog.*, v.74, p.1136-1140, 2010.
- FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen – New challenges. *Reprod. Dome. Anim.*, v.44 (Suppl. 2), p.336-341, 2009.
- FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2004. 1104p.
- FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; BALLESTER, J.; MEDRANO, A.; et al. The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. *FEBS Letters*, v.570, p.211–216, 2004.
- FLESC, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochi. Biophys. Acta*, v.1469, p.197-235, 2000.
- GÜNZEL-APEL, A. R.; GÜNTHER, C.; TERHAER, P.; et al. Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fert. supp.*47, p.271-278, 1993.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. *Reprod. Anim.*. 7. Ed. South Carolina: Kiawah Island, 2004. 513p.
- HARRISON, R. A . P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, v.88, p.343-352, 1990.
- HARROP, A. E. Artificial insemination in dogs, first transatlantic conception. *Brit. Vet. J.*, v.112, p.338-340, 1956.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Scie.*, v.62, p.3-22, 2000.
- IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Evaluation of the “Hamilton Thorn Computer-Based Automated System” for dog semen analysis. *Theriog.*, v.55, p.733-749, 2001.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Ferti.*, v.47, n.1, p.219-228, 1984.
- JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. *Canine and Feline Therioenology*.. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 592 p.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to hypo-osmotic test. *Theriog.*, v.39, p.1279-1289, 1993.
- KUTZLER, M. A.; Semen collection in the dog. *Theriog.*, v.64, p.747-754, 2005.
- LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. N. Ame. – S. Anim. Scie.*, v.21, n.3, 1991.
- LINDE-FORSBERG, C. Intra-uterine insemination in the dog using the scandinavian trans-cervical catheter and a comparison with other methods. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J. *Rec. Adv. S. Anim. Reprod.*. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: <[http://www.ivis.org/advances/Concannon/li\\_nde/chapter.asp?LA=1](http://www.ivis.org/advances/Concannon/li_nde/chapter.asp?LA=1)>. Acesso em: 12/01/2009.

- LINDE-FORSBERG, C.; STROM HOLST, B.; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriog.*, v.52, p.11-23, 1999.
- LOPES, G.; SIMÕES, A.; FERREIRA, P.; et al. Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. *Anim.Reprod. Scie.*, v.112, p.158-163, 2009.
- MATÁS, C.; DECUADRO, G.; MARTÍNEZ-MIRÓ, S.; et al. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriog.*, v.67, p.1087-1091, 2007.
- MAYER, D.T.; LASLEY, J.F. The Factor in Egg Yolk Affecting the Resistance, Storage Potentialities, and Fertilizing Capacity of Mammalian Spermatozoa. *J. Anim. Scie.*, v.4, p.261-269, 1945.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.*, v.67, p.1250-1258, 2002.
- MASCARENHAS, R.M. Avaliação individual e racial da qualidade do sêmen canino "in natura" e criopreservado em diferentes protocolos. 2008. 69p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Computer-assisted sperm analysis (CASA): a review. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, n.4, p.225-232, 2008.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zoot.*, v.51, n.1, p.71-78, 1999.
- MICHAEL, A. J., ALEXOPOULOS, C., PONTIKI, E. A., HADJIPAVLOU-LITINA, D. J., SARATSI, P.; VERVERIDIS, H. N. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Scie.*, v.112, p.119-135, 2009.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriog.*, v.63, p.2372-2381, 2005.
- MOUSTACAS, V. S.; ZAFFALON, F. G.; LAGARES, M. A.; et al. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriog.*, v.75, p.300-307, 2001.
- NIZANSKI, W., KLIMOWICZ, M., PARTYKA, A., et al. Effects of the inclusion of Equex STM into Tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5 degrees C. *Reprod. Domestic Anim.*, v.44 Suppl.2, p.363-365, 2009.
- NORMAN, C.; JOHNSON, C. E.; PORTERFIELD, I. D., et al. Effect of pH on the lifespan and metabolism of bovine sperm kept at room temperatures. *J. Dairy Scie.*, v.41, p.1803-1012, 1958.
- OHL, D. A.; DENIL, J.; CUMMINS, C.; MENGE, A. C.; SEAGER, S. W. Electroejaculation does not impair sperm motility in the beagle dog: a comparative study of electroejaculation and collection by artificial vagina. *J. Urol.*, v.152, p.1034-1037, 1994.
- OLAR, T. T.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Relationship among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal reserves of the dog. *Biol. Reprod.*, v.29, p.1114-1120, 1983.
- PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Scie.*, v.39, n.6, p.1144-1149, 1974.
- PEÑA, F. J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J. M. et al. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reprod. Dome. Anim.*, Suppl.12, v.41, p.21-29, 2006.
- PEÑA MARTÍNEZ, A. I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Scie.*, v.82-83, p.209-224, 2004.

- PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.*, v.23, p.399-404, 1940.
- PINTO, C. R. F.; KOZINK, D. M. Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.104, p.450-455, 2007.
- PINTO, C. R. F.; PACCAMONTI, D. L.; EILTS, B. E. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriog.*, v.52, p.609-616, 1999.
- PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen, *Theriog.*, v.62, p.1498-1517, 2004.
- RIGAU, T.; FERRÉ, M.; BALLESTER, J.; MOGAS, T.; PEÑA, A.; RODRÍGUES-GIL, L. E. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates *Theriog.*, v. 56, p. 801-815, 2001.
- RIGAU, T.; RIVERA, M.; PALOMO, M. J.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; MOGAS, T.; BALLESTER, J. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reprod.*, v.123, p.579-591, 2002.
- RIJSEELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D. et al. Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriog.*, v.57, p.1669-1681, 2002.
- RIJSEELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D. et al. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriog.*, v.60, p.1553-1568, 2003.
- RIJSEELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriog.*, v.64, p.706-719, 2005.
- RODRIGUEZ-GIL, J.E. Mammalian sperm energy resources management and the survival during conservation in refrigeration. *Reprod. Dome. Anim.*, v.41 (Suppl. 2), p.11-20, 2006.
- RODRIGUEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrossome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriog.*, v.42, p.815-829, 1994.
- ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. et al. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. *Theriog.*, v.51, p.1045-1058, 1999.
- ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriog.*, v.44, p.885-900, 1995.
- SCHÄFER-SOMI, S.; AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyser for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different extenders of predilution. *Anim. Reprod. Sci.*, v.102, p.1-13, 2007.
- SHAHIDUZZAMAN, A.K.; LINDE-FORSBERG, C. Induced immotility during long-term storage at +5 degrees C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriog.*, v.68, n.6, p.920-933, 2007.
- SOUZA, F. F.; BARRETO, C. S.; LOPES, M. D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriog.*, v.68, p.100-106, 2007.
- STRZEŻEK, R.; KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOWALÓWKA, M.; STRZEŻEK, J. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Pol. J. Vet. Sci.*, v.12, p.55-60, 2009.
- THRELFALL W. R. 2003: Semen Collection and Evaluation. In: ROOT KUSTRITZ MV: Small Anim. Theriog.. Butterworth Heinemann, Missouri, pp. 97-123.
- VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M. Membrana plasmática do espermatozoide. *Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia*, n.36, p.45-53, 2001.

- VAN der Ven, H.H.; JEYENDRAN, R.S.; AL-HASANI, S.; et al. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling teste) and in vitro fertilization. *J. Androl.*, v.7, p.190-196, 1986.
- VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; ULGUIM, M. V. F.; et al. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim. Reprod. Scie.*, v.115, p.323-327, 2009.
- VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: *In vitro* and *in vivo* studies. *Theriog.*, v.64, p.720-733, 2005.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Scie.*, v.62, p.23-53, 2000.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Scie.*, v.60-61, p.481-492, 2000.
- YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M. et al. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriog.*, v.54, p.579-585, 2000.
- JIANG, Z.; LI, Q.; HU, J.; LI, W.; ZHAO, H.; ZHANG, S. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobio.* v.54, p.301-304, 2007.
- ZHANG, S.; HU, J.; LI, Q.; JIANG, Z.; ZHANG, X. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *Afric. J. Biotech.*, v. 8, p. 6476-6480, 2009.
- ZÚCCARI, C. E. S. N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. 1998. 118F. Tese (Doutorado em Reprodução Anim.) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.