

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**Viviane Helena Chirinéa**

**EFEITO DO MEIO DE CONGELAÇÃO SOBRE  
AS CARACTERÍSTICAS  
MORFOFUNCIONAIS DO SÊMEN CANINO**

**BOTUCATU – SÃO PAULO  
2004**

**Viviane Helena Chirinéa**

**EFEITO DO MEIO DE CONGELAÇÃO SOBRE  
AS CARACTERÍSTICAS  
MORFOFUNCIONAIS DO SÊMEN CANINO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Orientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Denise Lopes**

BOTUCATU – SÃO PAULO  
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT DA  
INFORMAÇÃO DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – CAMPUS DE  
BOTUCATU – UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Chirinéa, Viviane Helena.

Efeito do meio de congelação sobre as características morfofuncionais do  
sêmen canino / Viviane Helena Chirinéa. – 2004.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2004.

Orientador: Maria Denise Lopes

Assunto CAPES: 50504002

1. Reprodução animal

CDD 636.0824

Palavras chave: Cão, Congelação, Sêmen e Meio Diluidor.

**Dedico**

Aos meus pais, **Vicente** e **Wilma**:

Vocês me transmitiram os valores  
mais importantes: a bondade, o  
perdão, a honestidade, a  
persistência, a consideração,  
e principalmente, a paciência.

Obrigada!!!

**Ofereço**

A minha orientadora **Prof<sup>a</sup>**  
**Denise**, e as minhas  
amigas **Fabiana** e **Maria**  
**Isabel**, pela atenção,  
auxílio e amizade.

Na sociedade em que vivemos, devemos nos ater a  
importância da união e do convívio com pessoas de

diferentes "estilos" e maneiras de pensar. Pensando assim, agradeço as pessoas que pela minha vida passaram e permaneceram.

Primeiramente a **DEUS**, por me oferecer sabedoria, fé e humildade.

À **Profª. Maria Denise Lopes**, pela orientação, amizade e confiança.

Ao **Prof. Frederico Ozanan Papa**, pela amizade e auxílio durante o experimento.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, que sempre estiveram a disposição para esclarecer qualquer dúvida na área de Reprodução Animal.

Aos funcionários: **Marquinho, Edilson, Cris e Valter**, pela amizade e carinho.

Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial ao **Sr. Nivalde, Maria Helena e Maria Euleda**, pelo auxílio no preparo do material e fotodocumentação da análise ultra-estrutural.

À **Profª Sheila Zambello de Pinho**, pelo auxílio durante a análise estatística.

Aos amigos da Reprodução Animal, que por muitas horas convivemos: **Claudinha, Milena, Lú Leal, Cely, Letícia e Bigu, Fabinho, Ian e Lú, Marcio, Juliana, Denise Leme, Zé, Danilas e Béia**. Obrigada pela amizade!

Aos amigos: **Marcelo, Chris, Bel Cunha e Carla**, pela amizade e carinho.

Às amigas: **Lê, Rê, Dezza, Kinha, Lú e Dri** e aos amigos, **Geléia, Rodolfo e meu irmão Jú**, que sempre me fortaleceram, seja com o apoio nas horas difíceis, ou mesmo, com as risadas de finais de semana. Valeu!!!

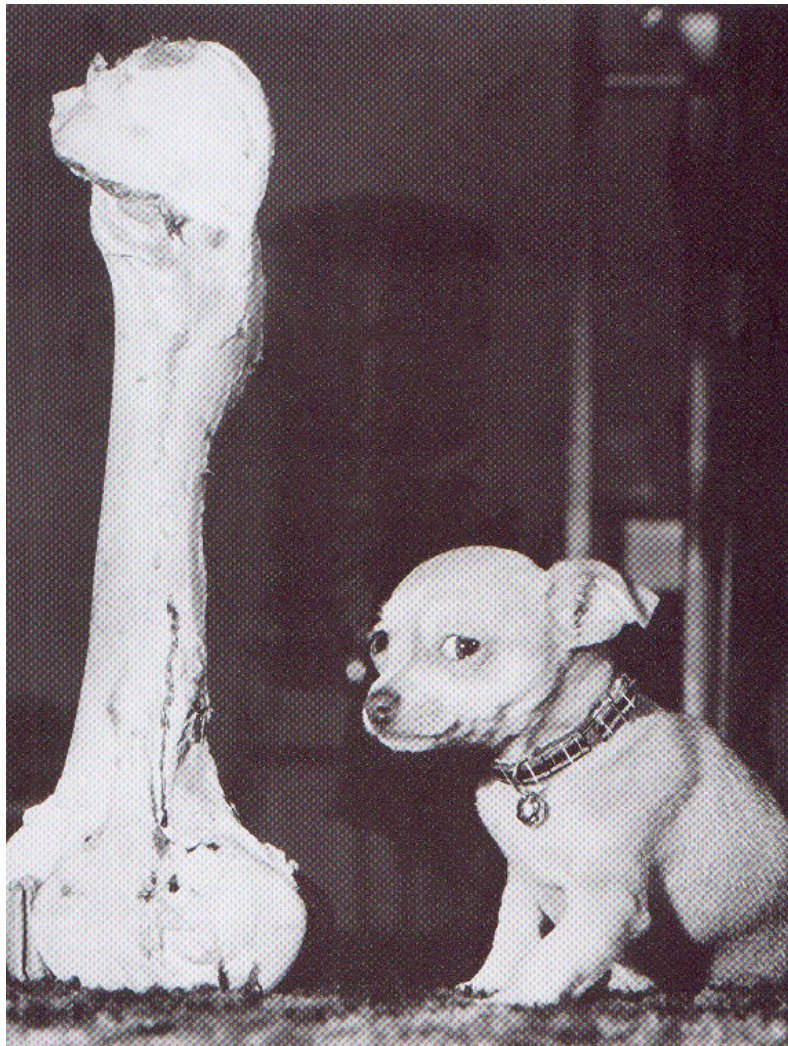
Às amigas de “República”: **Mari, Alicinha, Kinha, Dezza e Dani**, aquilo que vivemos, jamais voltará...

Às amigas de “equipe”: **Bel, Fá e Ju**, obrigada pela experiência, auxílio, convivência e acima de tudo, a amizade. Sem vocês, acho que nada disso aconteceria.

Aos **Cães** e seus respectivos proprietários, meu muito obrigada!

A **FUNDUNESP**, pelo auxílio financeiro.

À minha família: **Papai e Mamãe**, meus irmãos e cunhados (as): **Mô e Eduardo, Lú e Ana, Cá e Marcos, Jú e Chrys, Marcelo e Jú**, meus sobrinhos (as): **Marcelinho, Fabinho, Gio, Di, Fer, Lucca e Matheus**, que em todos os momentos me apoiaram e me fortaleceram sempre com muito carinho e amor. Com a ausência de vocês, eu nada seria. Obrigada por existirem na minha vida!



"Apesar dos nossos sentimentos de invencibilidade e imortalidade, nossa existência é muito mais frágil do que podemos imaginar".

(Greive, B.T., 2002)

## Sumário

	Página
1. Introdução.....	07
2. Objetivos.....	09
3. Revisão da literatura.....	10
3.a Criopreservação do sêmen.....	10
3.b Avaliação do sêmen.....	12
3.c Componentes do meio diluidor.....	16
3.d Curva de refrigeração, período de equilíbrio e congelação.....	22
3.e Descongelação do sêmen.....	22
4. Material e métodos.....	24
4.a Local.....	24
4.b Animais.....	24
4.c Colheita do sêmen.....	24
4.d Análise do sêmen.....	25
4.e Procedimento experimental.....	27
4.f Análise estatística.....	29
5. Resultados.....	30
6. Discussão.....	37
6.a Avaliação pós-refrigeração.....	38
6.b Avaliação pós-descongelação.....	41
7. Conclusões.....	44
8. Referências bibliográficas.....	45
9. Apêndice.....	57
Resumo.....	59
Abstract.....	60

## 1) INTRODUÇÃO

A seleção racial em cães vem sendo cada vez mais aperfeiçoada pelos criadores no Brasil e no mundo. Diante disso, a criopreservação do sêmen associada à técnica de inseminação artificial, destaca-se como procedimento importante para a preservação das características genéticas e fenotípicas das raças.

A maioria dos pesquisadores tem congelado o sêmen de cães, utilizando metodologia descrita para outras espécies. Esses estudos têm demonstrado que o sêmen descongelado de cães é de baixa qualidade, com taxas de concepção inferiores a de outras espécies.

O uso limitado do sêmen congelado na espécie canina deve-se principalmente aos baixos índices de fertilidade apresentados (ENGLAND, 1993). De acordo com Concannon e Battista (1989) e Silva e Verstegen (1995) a baixa fertilidade do sêmen congelado canino se deve principalmente a uma menor viabilidade pós-descongelação para fertilização do óvulo, dificuldade na identificação do momento ideal da inseminação artificial nas fêmeas e ao local de deposição do sêmen no trato genital feminino.

Nos últimos anos, o conhecimento sobre o mapeamento genético dos cães tem aumentado muito. Esses estudos têm demonstrado homologia entre alterações genéticas dos cães e dos homens, tornando o cão um importante modelo experimental. Para que o cão possa ser utilizado de forma conveniente como animal modelo há necessidade de se melhorar os protocolos de criopreservação de células espermáticas caninas. Com essa finalidade muitos estudos de congelamento de sêmen canino têm sido realizados, alguns inclusive já descrevendo o nascimento de filhotes vivos utilizando célula espermática congelada/descongelada (THIRUMALA et al., 2003).

Além da importância do cão como modelo experimental, as razões para a utilização do sêmen congelado são inúmeras, dentre elas, a possibilidade do transporte do sêmen para longas distâncias e o seu armazenamento por tempo indeterminado, permitindo a diminuição de gastos, que ocorreriam com a necessidade de deslocamento do animal. Evita-se ainda, o envio da fêmea para o local onde está o macho, o que é um procedimento desgastante e pode refletir

---

negativamente na eficiência reprodutiva, além dos riscos sanitários (LINDEFORSBERG e FORSBERG, 1989). Por outro lado, os testes de congelação de gametas e a posterior fertilização *in vivo* ou *in vitro* podem servir como base para as pesquisas em espécies canídeas em extinção, como o Lobo Guará brasileiro (*Chrysocyon brachyurus*), a Raposinha do Campo (*Pseudalopex sp*) (SILVA et al. 2000) e o cachorro do mato (*Cerdocyon thous*).

O primeiro êxito na congelação de sêmen canino foi descrito por Rowson (1954), enquanto Seager (1969) relatou a primeira prenhez resultante de inseminação artificial (IA) com a utilização de sêmen canino congelado. Desde essa época, diversos são os estudos nos quais investiga-se métodos de preservação de espermatozoides caninos pela congelação. No entanto, os resultados obtidos após IA com sêmen canino congelado ainda são bastante heterogêneos (LINDEFORSBERG e FORSBERG, 1989; ENGLAND, 1993).

## 2) OBJETIVOS

1) Análise comparativa de 2 (dois) meios diluidores (Tris/Glicerol e MP50), utilizados para congelação de sêmen canino, avaliados por meio das características morfológicas e funcionais das células espermáticas. Para atingir esse objetivo foi realizada uma combinação de testes:

- ❖ Morfologia espermática, microscopia eletrônica de transmissão e avaliação da integridade da membrana espermática, para determinar as alterações morfológicas das células espermáticas caninas.
- ❖ Motilidade e vigor espermáticos e teste hiposmótico, para determinar as alterações funcionais das células espermáticas caninas.

2) Quantificar os percentuais de perdas após as etapas de refrigeração e congelação do sêmen canino, nos 2 (dois) meios diluidores.

### 3) REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.a) CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

O processo de criopreservação representa uma interrupção artificial do progresso de maturação do espermatozóide, após a ejaculação. O maior problema com relação a criopreservação do sêmen é que mesmo utilizando técnicas adequadas, o padrão de sobrevivência dos espermatozoides pós-descongelação é restrito em cerca de 50% da população espermática (WATSON, 1995).

A congelação pode ser usada para preservar constituintes da ultraestrutura celular e também para o rompimento das células e organelas para o isolamento de seus constituintes. A congelação pode cessar algumas reações bioquímicas e acelerar outras (MAZUR, 1984).

O processo de criopreservação envolve a redução da temperatura, desidratação celular, congelação, e descongelação. O sêmen não está apto a suportar baixas temperaturas; portanto, a criopreservação diminui a viabilidade da célula e sua função normal (MEDEIROS et al., 2002).

Com o início do processo de congelação, que corresponde a uma fase de super resfriamento, a temperatura diminui para  $-5$  a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Nesta fase se inicia com a formação de cristais de gelo na solução extracelular, enquanto os componentes celulares permanecem descongelados (HAMMERSTEDT et al., 1990). Com a contínua diminuição da temperatura, a célula é então exposta a uma condição hipertônica, desde que a água extracelular já se encontra congelada, e existe uma alta concentração de sal extracelular, causando ainda mais o efluxo de água de dentro da célula. O efluxo de água para fora da célula diminui a possibilidade de formação de cristais de gelo intracelular (HOLT, 2000).

Com uma congelação lenta, a célula fica exposta por mais tempo a condição hiperosmótica, levando a danos irreparáveis. Essa condição hiperosmótica é também chamada de efeito soluto (HOLT, 2000).

As alterações celulares causadas pelo processo de congelação estão ligadas ao conhecimento termodinâmico e estrutural da membrana plasmática que envolve o espermatozóide. A membrana plasmática dessas células contem um arranjo não

usual de lipídeos (LIN et al.,1993) e é organizada dentro de diferentes domínios (HOLT,1984). Os lipídeos da membrana plasmática respondem a mudanças de temperatura alterando seu estado físico. Embora regiões de lipídeos na fase fluida e gel coexistam em temperaturas fisiológicas, a redução da temperatura favorece a transição da fase fluida para a gel (HOLT, 2000).

O choque térmico ocasionado durante o processo de criopreservação do sêmen, envolve danos na membrana celular e alterações na função metabólica, provavelmente causado por mudanças na configuração dos constituintes da membrana (PARKS et al., 1997). Os efeitos do choque térmico nas funções celulares, se devem a perda da permeabilidade da membrana, que podem ser observadas por meio de marcadores intracelulares, impermeáveis para as membranas plasmáticas íntegras. Ultraestruturalmente, o choque térmico é manifestado pela ruptura da membrana acrossomal (MEDEIROS et al., 2002).

De acordo com Mazur (1984), as mudanças celulares que ocorrem durante a congelação não estão associadas a sua habilidade de se armazenarem em temperaturas muito baixas, mas sim a sua letalidade numa zona de temperatura intermediária (-15°C a -60°C), que a célula atravessa duas vezes, uma durante a congelação e uma outra durante a descongelação.

Holt et al. (1992) demonstraram que os efeitos do choque térmico podem estar envolvidos na manifestação da crioinjúria durante o processo de reaquecimento das células, no momento da descongelação. Com o aumento da temperatura a membrana plasmática é submetida a rearranjos estruturais envolvendo os lipídeos e proteínas, cuja extensão e natureza são controlados pela interação entre temperatura e efeito soluto durante o processo de congelação.

Nenhuma reação térmica ocorre num sistema aquoso a temperatura de nitrogênio líquido (-196°C). Uma explicação para isso é que não existe água líquida ao redor de -130°C. O único estado físico que existe são os cristais e nesse estado a viscosidade é alta e a difusão insignificante; portanto a -196°C não há energia térmica para reação química (MCGEE et al., 1962).

As únicas reações que podem ocorrer num sistema aquoso congelado a -196°C são eventos fotofísicos como a formação de radicais livres e a produção de macromoléculas que se quebram como resultado direto do impacto pelas radiações ionizantes. Entretanto, a dose de radiação ionizante requerida para causar injúrias

nas células, levariam de 2000 a 4000 anos para causar este efeito (WATSON, 2000).

Hammerstedt et al. (1990) descreveu 5 diferentes etapas no processo de criopreservação do espermatozóide: 1) diluição e refrigeração; 2) penetração do crioprotetor e envasamento; 3) congelamento; 4) armazenamento; 5) descongelamento. Métodos específicos devem ser desenvolvidos para cada uma das espécies, pois cada uma dessas etapas tem um impacto único sobre a sobrevivência da célula no processo de criopreservação.

### **3.b) AVALIAÇÃO DO SÊMEN**

O objetivo da avaliação seminal é conhecer a capacidade fecundante do sêmen, relacionada com o número de células estruturais e funcionalmente normais (WATSON, 1990 e PEÑA, 1997).

Atualmente são descritos inúmeros testes funcionais e estruturais para avaliação do sêmen (AMANN, 1989; ENGLAND e ALLEN, 1992; CUNHA et al., 1996, HEWITT e ENGLAND, 1998), mas não existe nenhum teste ou avaliação isolada que seja capaz de prever de forma segura a capacidade fecundante de um ejaculado (AMANN, 1989; HAFEZ, 1988; e PEÑA, 1997).

Embora, a melhor maneira de se avaliar a fertilidade do sêmen seja a inseminação artificial com prenhez confirmada (PEÑA, 1997), é possível se combinar vários métodos ou testes para avaliar diferentes aspectos da função espermática simultaneamente. Desta forma, pode-se selecionar ejaculados com elevado potencial fecundante (HAFEZ, 1988) ou descartar aqueles que possuem baixa qualidade (PEÑA, 1997).

A motilidade espermática é um dos parâmetros mais utilizados para a valorização do sêmen em diferentes espécies, tanto para avaliação da qualidade do sêmen a fresco, como do sêmen conservado a curto ou longo prazo (PEÑA, 1997). A motilidade é uma das características necessárias ao espermatozóide para fertilização, embora, a correlação entre a motilidade e a capacidade da célula espermática para fertilizar o ovócito ainda não esteja totalmente esclarecida (SOUZA, 2003).

A avaliação da motilidade espermática pode ser realizada de forma subjetiva, utilizando um microscópio de contraste de fase ou, por programas de computador –

CASA - (VERSTEGEN et al., 2002; SOUZA, 2003; SILVA et al., 2003). O movimento espermático pode ser avaliado com o uso do Hamilton Torn Research. Esse sistema avalia a motilidade espermática total, motilidade total progressiva, padrão médio de velocidade espermática (VAP), velocidade de deslocamento em linha reta (VSL), velocidade de deslocamento curvilíneo (VCL), sobreposição do deslocamento retilíneo e do deslocamento curvilíneo (STR) e linearidade do movimento dos espermatozoides (LIN) (IGUER-OUADA e VERSTEGEN, 2001).

No estudo de Sanches et al. (2002) a motilidade espermática do sêmen a fresco em cães foi em média de 83,8% (60-90%); quando congelado com Tris/Glicerol (8%) e descongelado esse parâmetro apresentou média de 47,9% (10-70%). Cardoso et al. (2002) obtiveram com o diluidor a base de água de coco, acrescido de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol, uma motilidade espermática média pós-descongelação de 56,7%. Silva et al. (2003) obtiveram resultados de motilidade espermática da ordem de 55,0% e 54,6% após a descongelação do sêmen canino submetido à adição única ou fracionada, respectivamente, de glicerol a 6%.

Outro parâmetro normalmente avaliado numa amostra de sêmen é o vigor espermático, referido como a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozoides móveis e observada numa escala de 0 a 5 (SILVA et. al., 2003).

A concentração espermática nos cães varia conforme a idade do animal, volume testicular, atividade sexual, volume colhido da terceira fração e estação do ano (JOHNSTON et al. 2001). O cálculo da concentração espermática, juntamente com o volume do ejaculado e a porcentagem de motilidade espermática, determinam o número de doses de sêmen a serem armazenadas numa palheta (PEÑA, 1997). A concentração espermática nos cães pode variar de 200 milhões a 10 bilhões de espermatozoides no volume total do ejaculado, porém, o valor médio é de 500 milhões de espermatozoides (JOHNSTON, 1991; FELDMAN e NELSON, 1996; SILVA et al., 2003; THEREFALL, 2003).

Peña e Linde-Forsberg (2000) comparando 4 diferentes concentrações espermáticas (50, 100, 200 e 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) envasadas em palhetas de 0,5mL, obtiveram nas amostras de 50x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL um rápido declínio da motilidade espermática quando comparada com as demais concentrações espermáticas. Esses mesmos autores mostraram que as amostras de 400x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL apresentaram um declínio menor da motilidade

espermática, embora sem diferença significativa quando comparada com concentrações de  $100 \times 10^6$  espermatozóides/mL.

Utilizando técnica de congelação de sêmen canino, Peña (1997) conseguiu melhores resultados de motilidade espermática pós-descongelação com meio Tris/Glicerol a 8% e utilizando concentrações de  $80 \times 10^6$  espermatozóides/mL, envasadas em palhetas de 0,5 mL.

Taxas de fertilidade satisfatórias com sêmen congelado foram obtidas com doses inseminantes de  $35 \times 10^6$  espermatozóides móveis após inseminação artificial intra-uterina (IAIU) e de  $50 \times 10^6$  espermatozóides móveis após inseminação artificial intra-vaginal (IAIV) (WILSON, 1993). Deste modo, a IAIU requer uma menor concentração de espermatozóides, do que a técnica de IAIV (Silva et al., 2003).

Na espécie canina, uma amostra de sêmen para ser considerada normal, quanto à morfologia espermática, deve ter a proporção de defeitos maiores e menores de no máximo 30%, e a porcentagem de defeitos maiores não deve ultrapassar 10% (CBRA, 1998; THEREFALL, 2003). Acredita-se que a morfologia espermática se correlacione com a fertilidade *in vivo* mais do que qualquer outro parâmetro de avaliação seminal (RENTON et al., 1986; OETTLÉ, 1993; FELDMAN e NELSON, 1996).

Soares et al. (2002), utilizando o meio Tris-gema com 0,8M de glicerol, obtiveram após a descongelação médias de alterações morfológicas totais, primárias e secundárias de  $34,00\% \pm 7,14$ ;  $8,00\% \pm 3,24$ ; e  $26,00\% \pm 4,06$ , respectivamente. Cardoso et al. (2002) trabalhando com 4 diferentes meios diluidores para congelação apresentaram diferentes percentuais de alterações morfológicas totais pós-descongelação (49,5%, 48%, 47,5% e 23,8%).

O teste hiposmótico e a análise da integridade das membranas espermáticas avaliam a integridade e funcionalidade da membrana celular do espermatozóide (KUMI-DIAKA, 1993) o que é crucial no processo de fertilização (CHIRINÉA et al., 2003).

Uma característica da membrana das células espermáticas é sua capacidade de transporte seletivo de moléculas, e esse transporte é um processo essencial para a viabilidade e capacidade fertilizante do espermatozóide, exigindo-se que essa membrana apresente-se íntegra para ser funcional (KUMI-DIAKA, 1993). Quando a célula é exposta à condição hiposmótica, a água penetra no interior das células para atingir o equilíbrio osmótico. Esse influxo de água aumenta o volume das células e a

membrana plasmática se dobra; a cauda do espermatozóide parece ser particularmente sensível as condições hiposmóticas (INAMASSU et al., 1999).

Fraser (1984), relatou uma alta correlação entre o teste hiposmótico, motilidade espermática e reação do acrossomo, o que pode aumentar de forma significativa à previsão da capacidade fertilizante do espermatozóide. As membranas devem estar intactas e funcionais, para manter os componentes intracelulares necessários para a penetração e fertilização do óvulo.

Sanches et al. (2002) utilizando o meio Tris/Glicerol (8%) encontraram resultados de teste hiposmótico de  $87,9\% \pm 8,1$  no sêmen a fresco e  $53,7\% \pm 13,0$  no sêmen descongelado a  $40^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos, verificados com uso de uma solução de 55 mOsmol.

Embora a técnica de eosina/negrosina ainda seja utilizada rotineiramente em muitos laboratórios como forma de avaliar a membrana plasmática, ela tem sido substituída por testes fluorescentes (HARRISON e VICKERS, 1990).

Garner et al. (1986) empregaram uma combinação dos corantes diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de propídio, para avaliar as células espermáticas de mamíferos. Estas colorações avaliam a presença de rupturas como resultado da morte espermática, onde a membrana pode estar fisicamente intacta, mas quimicamente inativa (KUMI-DIAKA e BADTRAM, 1994).

O iodeto de propídeo é impermeável a membrana íntegra, entretanto, pode se tornar permeável quando há rupturas na membrana, penetrando na célula e ligando-se ao DNA. A observação em microscópio de epifluorescência indica as células com membrana íntegra em coloração verde fluorescente e células com membrana lesada coradas em vermelho ou vermelho e verde (SOUZA, 2003).

A importância de se avaliar a integridade estrutural da célula espermática prende-se ao fato de que a funcionalidade do gameta está diretamente ligada a integridade da membrana plasmática, ou seja, para toda lesão estrutural tem-se uma alteração funcional correspondente (ZUCCARI, 1998).

Através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), estudos foram conduzidos, mostrando muitos espermatozóides com estrutura normal, em amostras de sêmen fresco de cães, embora a membrana plasmática apresentasse edema,

devido à fixação das amostras em glutaraldeído (LANDIN-ALVARENGA\*). Após a descongelação os espermatozóides apresentaram além do edema de membrana plasmática, danos acrossomais com perda de conteúdo e vesiculações (STROM-HOLST et al., 1998; BURGESS et al., 2001).

Medeiros (2003) avaliou por meio da MET, um *pool* de amostras de sêmen eqüino descongelado, e classificou 100 seções longitudinais de cabeça espermática (acrossomo e região pós-acrossomal) quanto às alterações de membrana acrossomal externa (ondulação, destacamento ou rompimento) e quanto às alterações do acrossomo (vesiculação, destacamento, ausência). Obteve resultados entre 25 % e 43,5% de acrossomas íntegros, 11,5% a 17,5% de membrana acrossomal externa ondulada e 6% a 10,5% de acrossomas vesiculados.

### **3.c) COMPONENTES DO MEIO DILUIDOR**

O uso de uma ampla variedade de meios diluidores para congelação de sêmen canino tem sido citado (SILVA e VERSTEGEN, 1995; MOURA et al., 1999; BUENO et al, 2001; CUNHA, 2002;). A composição do meio diluidor é de vital importância para criopreservação do sêmen e deve ser específica para cada espécie. Foote (1964) e Foote e Leonard (1964) foram os primeiros pesquisadores a investigar sistematicamente a combinação e a quantidade de vários componentes dos diluidores para a preservação do sêmen de cão.

De acordo com Concannon e Battista (1989), o meio diluidor deve apresentar:

- 1) tampões que impeçam as mudanças nocivas de pH;
- 2) substância protetora contra choque térmico durante o resfriamento;
- 3) nutrientes usados como fontes de energia;
- 4) prevenção no crescimento de bactérias;
- 5) pressão osmótica fisiológica e concentração de eletrólitos adequada;
- 6) crioprotetores para reduzir os danos da congelação.

---

\* Landin-Alvarenga, F.C (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Câmpus de Botucatu)  
Comunicação pessoal, 2003.

### Tampões

A atividade metabólica do espermatozóide resulta num acúmulo de íons de hidrogênio, assim a utilização de um tampão no diluidor é necessário para neutralizar o pH ácido do meio e evitar a diminuição da motilidade espermática progressiva. O pH ótimo para os espermatozóides é próximo da neutralidade (ENGLAND, 1993).

Foote (1964) e Foote e Leonard (1964) após examinarem os efeitos de diferentes tampões (citrato x fosfato x glicina), a porcentagem de gema de ovo, e o pH do sêmen canino armazenado a 5°C, concluíram que a melhor combinação para preservar a motilidade espermática foi: 20% de gema de ovo (v/v), 1,16% de citrato de sódio, 0,75% de glicina, 1% de glicose e pH=6,6.

Nos trabalhos realizados por Battista et al., (1989), Olar et al., (1989), e Thomas et al., (1993) o Tris (Tris-hidroxymethyl-aminometano) preservou melhor a motilidade espermática pós-descongelação.

Os benefícios do tampão usado em um meio diluidor à base de gema de ovo, podem estar na dependência do método de envasamento. O Tris resultou em aumento da motilidade e longevidade quando as amostras foram congeladas em palhetas (BATTISTA et al., 1989; OLAR et al., 1989).

### Osmolaridade

A osmolaridade se refere ao número de partículas (soluto) numa solução. É influenciada não só pela pressão osmótica da solução, mas também pelo ponto crioscópico. O ponto crioscópico do sêmen canino é de aproximadamente -0,55°C, equivalente a uma concentração de 300 mOsmol (SALISBURY et al., 1978).

Mann (1964), observou que diluidores hipertônicos eram menos prejudiciais aos espermatozóides que os hipotônicos; por isso a maioria dos diluidores recomendados para congelação do sêmen canino são hipertônicos.

Os efeitos nocivos dos diluidores hipotônicos estão relacionados a sua capacidade em aumentar o conteúdo intracelular de água e a redistribuição dos íons, situações que podem ter importantes conseqüências durante a congelação. Por outro lado, em uma solução hipertônica os espermatozóides perderiam água ou ganhariam solutos osmoticamente ativos, dependendo da concentração e da

permeabilidade da membrana celular a água. Os diluidores hipertônicos atuam reduzindo a água intracelular antes da congelação, diminuindo a formação de gelo intracelular (WATSON, 1979).

### Gema de Ovo

A gema de ovo é rotineiramente incluída nos diluidores utilizados na criopreservação de sêmen de várias espécies domésticas e exóticas. A gema de ovo é considerada um fator de proteção contra o choque térmico e efeito da fase transição dos lipídeos na membrana espermática (DROBNIS et al., 1993). Porém, pode possibilitar a transmissão de doenças, criando assim, um obstáculo para comercialização de sêmen entre países

Watson (1976) mostrou que o componente ativo da gema de ovo é uma lipoproteína de baixa densidade, mas evidências sobre seu mecanismo de ação permanecem incertas.

Estudos criomicroscópicos de espermatozóides de carneiro demonstraram que a gema de ovo protege a célula contra as alterações de membrana e perda da motilidade induzida numa temperatura abaixo do ponto de congelação extracelular (-20°C). Se a modulação do comportamento da fase de transição não ocorre, um mecanismo alternativo é provavelmente a ligação da gema de ovo a superfície celular com modificação da permeabilidade da membrana e ativação da enzima adenil ciclase. A permeabilidade a água e a vários íons também podem ser alteradas pela associação de uma lipoproteína da gema de ovo com o glicocálice (ou camada lípidica externa), e isso, juntamente com a ativação de bombas iônicas, aumentariam a fosforilação e afetariam o comportamento osmótico da célula em resposta aos crioprotetores permeáveis como o glicerol (HOLT, 2000).

Uma grande variedade na concentração de gema de ovo é descrita na preservação do sêmen canino. Foote e Leonard (1964) reportaram o uso de diluidores com 20% de gema de ovo, e essa porcentagem parece ser o padrão usado por muitos autores (FONTBONNE e BADINAND; 1993, RODRIGUES-MARTINES et al., 1993; NÖTHLING et al., 1995; SILVA et al., 1996; SILVA, 2003).

Davies (1982) obteve melhores taxas de sobrevivência espermática pós-descongelação incluindo 20% de gema de ovo, frente a 5% (v/v). No entanto, não encontrou diferenças significativas na motilidade pós-descongelação quando

comparou taxas de 10 e de 20% (v/v), embora, os resultados absolutos da motilidade pós-descongelação tenham sido superior quando utilizaram 20%.

### Fonte de Energia

Os açúcares são incluídos nos diluidores seminais como substratos energéticos exógenos, como componentes osmóticos e como agentes crioprotetores (WATSON, 1979).

Os açúcares, utilizados como crioprotetores, agem aumentando a porcentagem de água não congelada a uma dada temperatura ou mesmo reduzindo a concentração de sais numa solução aquosa ainda não congelada. A glicina, prolina e a trealose interagem diretamente com as proteínas e lipídeos da membrana, alterando sua fase de transição e estado de hidratação (HOLT, 2000).

Os monossacarídeos, glicose e frutose, são açúcares metabolizados pelos espermatozóides. Estas substâncias exercem um certo efeito benéfico, sugerindo que além da sua utilização como substrato energético, também atuam como substitutos de eletrólitos na manutenção do equilíbrio osmótico do diluidor (SALISBURY et al., 1978)

A maioria dos meios diluidores utilizados na criopreservação do sêmen canino contem glicose ou frutose (SILVA et al., 1996; HAY et al., 1997; ROTA, 1998; CHIRINÉA et al. 2003). Investigações iniciais sobre o metabolismo energético do sêmen fresco de cães incubados em glicose ou frutose, indicaram que a frutose é mais eficiente que a glicose na obtenção de níveis energéticos. Além disso, existem indicações que a frutose possivelmente tenha uma relação como um fator ativador do espermatozóide após a ejaculação (RIGAU et al., 2000).

Chirinéa et al. (2003) utilizando diferentes suplementações de açúcares no meio diluidor para congelação de sêmen canino, demonstraram uma superioridade do dissacarídeo lactose em relação aos demais.

### Antibióticos

Os ejaculados são estéreis, mas sua contaminação a partir da uretra, pênis e prepúcio é inevitável durante o processo de colheita. Essa contaminação pode ser menor com o uso de técnicas assépticas e medidas de higiene antes e durante a

coleta. A contaminação bacteriana pode afetar negativamente a fertilidade, pela própria presença das bactérias, pela produção de toxinas, por degradação dos componentes do meio, ou ainda, pela utilização de substratos metabólicos. Essa situação determina a necessidade de incorporar aos diluidores substâncias de efeito antimicrobiano (WATSON, 1990).

A associação clássica de Penicilina e Estreptomicina resulta numa preparação antibiótica eficaz e possivelmente a mais utilizada na elaboração de diluidores seminais (WATSON, 1979).

Silva (2001), estudando o sêmen refrigerado eqüino, mostrou que o meio diluidor contendo 50µg de cefalotina e 6,25mg de taurina foi menos prejudicial à longevidade espermática.

### pH

O pH da 2ª fração do ejaculado canino é de aproximadamente 6,2 (ROTA et al., 1995) e a 3ª fração, ou fluido prostático, apresenta pH de 6,8. O pH ótimo de um meio diluidor pode ser diferente em cada uma das etapas do processo de congelação do sêmen.

O pH das soluções salinas tamponadas depende da temperatura, que por sua vez sofre várias oscilações durante o processo de congelação (VAN DEN BERG e ROSE, 1959). Alguns pesquisadores têm titulado seus meios diluidores a um pH de 6,8 (FOOTE, 1964), 6,7 (ROTA et al., 1995), 7,0 (SMITH e GRAHAM, 1984), 7,1 (THOMAS et al., 1993) e 7,4 (HAY et al, 1997).

Salisbury et al. (1978), observaram que as alterações pré-congelação eram menores quando o pH do diluidor era de 6,5, mas um menor prejuízo da motilidade espermática, durante a congelação, foi observada com pH de 7,5.

### Crioprotetor

Os crioprotetores podem ser classificados em grupos, de acordo com o seu mecanismo de ação. O glicerol juntamente com o metanol, ethileno-glicol, 1,2-propanodiol, butanediol, acetamina e o DMSO pertecem ao grupo que penetra no citoplasma das células. Açúcares como rafinose e lactose, polímeros como polivinil pirrolidona (PVP) e compostos anfipáticos como glicina, glutamina e prolina

também têm sido identificados como substâncias crioprotetoras potenciais (HOLT, 2000).

Durante o processamento do sêmen ocorrem movimentos bruscos de água e do crioprotetor nas células espermáticas, sendo possível que ocorram inclusive movimentos similares em cada subcompartimento celular (HAMMERSTEDT et al., 1990).

Desde que Polge et al. (1949), demonstraram a eficácia do glicerol, como crioprotetor universal, esta substância tem sido utilizada amplamente.

Lovelock e Polge (1954) propuseram que os efeitos protetores do glicerol eram mediados pelas suas propriedades coligativas, pela diminuição do ponto de congelação e conseqüente perda da concentração de eletrólitos na fração não congelada, diminuindo desta maneira o *efeito soluto* imposto durante o processo de congelação.

A concentração ótima de glicerol adicionada ao meio diluidor é um equilíbrio entre os efeitos de proteção e efeitos adversos. Nesse aspecto os canídeos parecem ser semelhantes a outras espécies de mamíferos, onde uma variação entre 2 e 8% de glicerol é o padrão, com adição no início, durante ou fim da refrigeração (OLAR et al., 1989; HAY et al., 1997).

Fontbonne e Badinand (1993), examinaram a temperatura na qual o glicerol foi adicionado (5°C x temperatura ambiente), o método de adição (uma ou várias etapas) e a concentração de glicerol. Os autores não verificaram diferença na motilidade pós-descongelação, entre os diferentes métodos de adição do glicerol, em qualquer das temperaturas testadas, ou entre concentrações de glicerol compreendidas entre 3,2 ou 6,4%.

Posteriormente, Peña et al. (1998), também demonstraram que a temperatura de glicerolização não afetou a qualidade espermática pós-descongelação; entretanto, observaram que tanto a motilidade pós-descongelação como a integridade do acrossoma, foram superiores após o uso de um meio diluidor contendo 8% de glicerol quando comparado a 2%, 4% e 6%.

Silva et al., 2003 não encontram diferença significativa na qualidade seminal quando compararam os efeitos da glicerolização realizada em uma ou duas etapas durante os procedimentos de congelação; esses autores utilizaram diluidores com uma concentração final de 6% de glicerol.

### **3.d) CURVA DE REFRIGERAÇÃO, PERÍODO DE EQUILÍBRIO E CONGELAÇÃO**

De acordo com Watson (1979) e Jasko (1994), antes da congelação propriamente dita, os espermatozóides devem permanecer um período de tempo a uma determinada temperatura – período de equilíbrio, para que ocorra diminuição do metabolismo espermático e para que iniciem as interações entre as células espermáticas e os componentes do meio diluidor, antes do estresse da congelação, diminuindo, dessa forma, os riscos de um choque térmico. O período de equilíbrio ideal pode variar para cada espécie animal e para cada diluidor utilizado (CHACUR, 1996).

Vários períodos de refrigeração e equilíbrio (de 45min. a 5 hs) têm sido descritos para os canídeos (FONTBONNE e BADINAND, 1993; SILVA et al., 1996). Olar et al. (1989), demonstraram que a melhor motilidade pós-descongelação foi conseguida quando o sêmen de cão foi refrigerado (de 37° a 5°C) por 1 hora e equilibrado a 5°C por 2 horas usando um meio diluidor Tris-gema de ovo contendo 3 ou 4% de glicerol.

De acordo com HAMMERSTEDT et al. (1990), se a taxa de congelação utilizada for rápida, deve-se utilizar uma descongelação rápida, para ocorrer a dissolução dos cristais de gelo que se formaram durante o processo de congelação, antes que ocorra a recristalização temporária, que causaria danos a membrana plasmática e organelas celulares.

### **3.e) DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN**

Resultados de recentes investigações têm levantado a hipótese que os espermatozóides criopreservados sofrem mais alterações durante a descongelação do que durante o processo de congelação (HOLT et al., 1992; HOLT e NORTH, 1994; ROTA et al., 1998), associado as mudanças da condição hiperosmótica durante o congelação, para as condições isosmótica, durante a descongelação. Por razões práticas o sêmen congelado de cães é freqüentemente descongelado a 37°C, embora muitos pesquisadores (DOBRINSKI et al., 1993; ROTA et al., 1998) tenham encontrado que temperaturas mais altas aumentam a viabilidade após descongelação.

A descongelação de sêmen canino com altas temperaturas e curtos períodos de exposição, proporciona melhores resultados de viabilidade e fertilidade; esse fato deve-se provavelmente a diminuição dos riscos de recristalização dos microcristais intracelulares que podem ocorrer durante uma descongelação lenta (OLAR, 1984; IVANOVA-KICHEVA et al., 1995; PEÑA, 2000).

A comparação de dois protocolos de descongelação para sêmen canino em *pellets* incluíram: 55°C/5seg x 37°C/8seg., em solução de NaCl a 0,9%, resultou numa motilidade pós-descongelação de 29,3% x 26,1% e uma longevidade de 184,4 x 148,9 minutos para 55°C e 37°C respectivamente (IVANOVA-KICHEVA et al., 1995).

No trabalho realizado por Peña e Linde-Forsberg (2000), no qual a descongelação do sêmen foi realizada a 70°C por 8 segundos, a motilidade total e progressiva, integridade de membrana e *status* acrossomal foram significativamente mais alto quando comparado com protocolos de descongelação a 37°C por 15 segundos, embora utilizando diferentes taxas de congelação.

De acordo com Cunha (2002) a descongelação a 72°C/8seg. foi favorável ao sêmen canino congelado, utilizando o meio diluidor a base de Tris/glicina-gema e diversas taxas de congelação.

## 4) MATERIAL E MÉTODOS

### 4.a) Local

O experimento foi realizado nas dependências do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da FMVZ – UNESP – Botucatu.

### 4.b) Animais

Foram utilizados 10 (dez) cães adultos (tabela 1), com idades variando de 1 (um) a 4 (quatro) anos, provenientes de criatórios particulares. Os animais se apresentavam em perfeitas condições de manejo sanitário-dietético.

**Tabela 1:** Número e raças dos animais utilizados no experimento.

Nº de animais	Raças
3	Boxer
1	Dálmata
2	Labrador
1	Lhasa Apso
3	Rottweiler

### 4.c) Colheita do Sêmen

O sêmen foi colhido no próprio criatório, transportado imediatamente até o Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS), para análises e processamento.

Após a limpeza do prepúcio, o sêmen foi colhido por manipulação digital do pênis, na ausência de uma fêmea no estro. Foi colhido 1 (um) ejaculado de cada animal, totalizando 10 (dez) ejaculados. Os ejaculados foram colhidos em funil plástico, acoplado a um tudo plástico graduado, transportado em uma garrafa térmica com água aquecida (35°C) e protegido da luz. Todo equipamento de colheita foi previamente limpo e esterilizado. A primeira fração do sêmen foi desprezada, a segunda e parte da terceira fração foram utilizadas para as análises morfofuncionais, e processamento do sêmen.

#### 4.d) Análise do Sêmen

Imediatamente após a colheita, o sêmen transportado foi mantido em banho-Maria a 37°C e analisado.

#### ANÁLISE FUNCIONAL

**Motilidade e Vigor Espermático:** avaliados segundo o método descrito por KRAUSE (1966), onde uma gota de sêmen foi colocada sobre lâmina aquecida (38-40°C) e recoberta por lamínula. O exame foi realizado utilizando um microscópio de contraste de fase (**Carl Zeiss, Jena, Alemanha**), num aumento de 20X. O resultado foi expresso em porcentagem (0 a 100%) para espermatozóides com movimentos progressivos; e um escore de 0 a 5 para o vigor, onde 0 representou espermatozóides sem movimento e 5 espermatozóides com movimentos rápidos e vigorosos.

**Concentração Espermática:** foi determinada pela contagem das células espermáticas em câmara hematimétrica de “Neubauer”, após diluição do sêmen total em água destilada (1:19). O número de espermatozóides expresso por mL foi multiplicado pelo volume do ejaculado, para determinação da concentração dos espermatozóides totais, e multiplicado pela motilidade para determinação de espermatozóides totais móveis.

**Teste Hiposmótico:** foi realizado segundo a técnica descrita por JEYENDRAN et al. (1984) e INAMASSU et al. (1999), e consistiu em misturar 0,1 mL do sêmen em 0,9 mL da solução hiposmótica - 150 mOsmol - (**citrato de sódio 7,35g, frutose 13,51g, água destilada 1000mL e a osmolaridade verificada em osmômetro**). E uma outra mistura, utilizada como controle, de 0,1 mL do sêmen em 0,9 mL da solução isosmótica - 300 mOsmol - (**citrato de sódio 14,7g, frutose 27,02g, água destilada 1000mL e a osmolaridade verificada em osmômetro**).

As amostras preparadas foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5mL, e levadas ao banho-Maria a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, foram agitadas e uma gota foi transferida para lâmina de vidro, recoberta por uma lamínula, e a leitura realizada sob microscópio de contraste de fase (**Carl Zeiss, Jena, Alemanha**). Foram contadas 200 células espermáticas. Na solução hiposmótica

foram considerados espermatozóides com integridade funcional e estrutural da membrana, aqueles que apresentavam edema de cauda, vistos pelo seu enrolamento. A solução isosmótica foi utilizada como controle e o resultado do teste foi dado em porcentagem, onde o número de espermatozóide com a cauda enrolada obtido na solução hiposmótica, era subtraído do número de espermatozóides com a cauda enrolada na solução isosmótica, multiplicados por 100%, e divididos por 2.

$$TH = \frac{\text{n}^\circ \text{ sptzs cauda enrol. sol. hipo} - \text{n}^\circ \text{ sptzs cauda enrol. sol. iso} \times 100\%}{2}$$

**pH:** determinado utilizando-se fitas colorimétricas com variação de 4,0 a 10,0 (Merck KgaA, Alemanha).

### ANÁLISE MORFOLÓGICA

**Morfologia Espermática:** foram confeccionados esfregaços do sêmen em lâminas, corados pelo método de KARRAS modificado (PAPA et al., 1986). Foram avaliadas 200 células de cada esfregaço e as alterações espermáticas foram classificadas de acordo com Mies Filho (1987). Os resultados foram expressos em porcentagem de defeitos maiores, defeitos menores e células normais.

**Sondas Fluorescentes:** a coloração fluorescente foi realizada de acordo com a técnica descrita por HARRISON & VICKERS (1990), e adaptada ao cão por CUNHA et al. (1996). As soluções estoques de diacetato de 6-carboxifluoresceína (9,2 mg diacetato de 6-carboxifluoresceína em 20 mL dimetilsulfóxido (DMSO)), iodeto de propídeo (10 mg de iodeto de propídeo em 20 mL solução fisiológica), formaldeído (diluição de 1:80 de formalina a 40% em solução fisiológica) e citrato de sódio a 3% (3,0 g de citrato de sódio em 100 mL de solução fisiológica) foram preparadas. Uma alíquota de 10 µl de sêmen foi diluída em 40µl da solução de trabalho (20 µl da solução estoque de diacetato de 6-carboxifluoresceína, 10 µl da solução estoque de iodeto de propídeo, 10 µl de solução estoque de formaldeído e 960 µl de citrato a 3%), preparada no momento do uso. Após 10 minutos da diluição, uma gota do material foi depositada entre lâmina e lamínula e analisada em microscópio de epifluorescência (NIKON –

**Episcopic Fluorescence Attachment “EFA” HalogenLamp Set)** com objetiva de 40x. Foram contadas 200 células e classificadas como:

✓ Células com membrana íntegra: células coradas em verde fluorescente.

✓ Células com membrana lesada: células coradas em vermelho ou em verde fluorescente e vermelho.

**Microscopia de Transmissão:** uma amostra do ejaculado foi centrifugada a 800g por 15 minutos (CUNHA e LOPES, 1999), o sobrenadante desprezado e o “pellet” fixado em glutaraldeído a 2,5%, As amostras foram mantidas em refrigeração a 5°C, até o momento do processamento:

- ❖ Pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,3 (2 horas);
- ❖ Lavagem em água destilada (2x de 5 minutos);
- ❖ Contrastação em bloco em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% (2 horas);
- ❖ Desidratação em seqüência crescente de soluções de acetona;
- ❖ Embebição e inclusão em resina Araldite®;
- ❖ Obtenção de cortes semi-finos de 0,5 µm, para escolha dos blocos adequados;
- ❖ Obtenção dos cortes ultra-finos 50nm apartir dos blocos escolhidos;
- ❖ Contrastação dos cortes ultra-finos com solução saturada de acetato de uranila em álcool etílico 50% e, posteriormente, em citrato de chumbo.

O material foi examinado ao microscópio eletrônico de transmissão, modelo Philips CM 100, e fotodocumentado.

#### **4.e) Procedimento Experimental**

No início da fase experimental cada animal foi submetido a um exame andrológico completo, que constava de: histórico reprodutivo, exame clínico geral e específico do aparelho genital, colheita e análise do sêmen. Após a constatação da normalidade clínica e reprodutiva, o animal foi considerado apto a integrar o grupo experimental.

Após a colheita e o transporte até o Laboratório, o sêmen foi analisado quanto as suas características morfofuncionais **(T1)**; em seguida, o ejaculado foi dividido em duas partes iguais. Cada parte foi diluída (1:1) em Meio Tris sem glicerol, modificado pela adição do sulfato de amicacina **(3g de TRIS, 1,7g de Ácido Cítrico, 1,25g de Frutose, 0,020g de Sulfato de Amicacina, 20mL de Gema de Ovo e 80mL de Água Destilada)** e centrifugadas em 800g por 15 minutos (Cunha e Lopes,1999).

Após a centrifugação os sobrenadantes foram desprezados e cada *pellet* ressuspendido em: Tris/Glicerol, modificado pela adição do sulfato de amicacina - **M1- (3g de TRIS; 1,7g de Ácido Cítrico; 1,25g de Frutose; 0,020g de Sulfato de Amicacina; 8mL de Glicerol; 20mL de Gema de Ovo; e 72mL de Água Destilada)** e o MP50 - **M2- (açúcares: glicose, lactose e rafinose; tampões: citrato de sódio, citrato de potássio e EDTA; gema de ovo; leite em pó desnatado; substrato para cultivo celular: Hapes e DME-Dulbelcco's Modified Eagle's Médium; antibiótico: sulfato de amicacina; e crioprotetores intracelulares: glicerol e dimetil-formamida)** (PAPA et al., 2002).

O volume adicionado de cada meio foi estabelecido após a avaliação da concentração espermática inicial e obtendo-se uma diluição final de  $80 \times 10^6$  espermatozóides por mL. O sêmen assim diluído foi envasado em palhetas francesas de 0,5 mL, previamente identificadas com o nome do animal, a data da colheita e o meio diluidor utilizado, contendo portanto,  $40 \times 10^6$  espermatozóides móveis por palheta.

As palhetas foram então levadas até o refrigerador programado a 5°C (MINITUB<sup>®</sup>) por 60 minutos. Após isso , foram retiradas duas palhetas de cada meio para avaliações, onde uma foi utilizada para a análise ultraestrutural e a outra para análise morfofuncional do sêmen e mensuração do pH **(T2)**.

As palhetas restantes foram transferidas para uma caixa de isopor, contendo 4 cm de nitrogênio líquido, posicionadas de forma a permanecerem numa distância de 6 cm da superfície do nitrogênio (PENA, 1997), por 20 minutos. Após esse período as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijões criogênicos.

As amostras foram descongeladas numa temperatura de 70°C por 8 segundos (PEÑA e LINDE-FORSBERG, 2000), e novamente analisadas para as características morfofuncionais **(T3)**.

Para a análise ultraestrutural foi realizado um *pool* das amostras, tanto para o sêmen fresco (**T1**), sêmen refrigerado em Tris/Glicerol (**T2M1**), sêmen refrigerado em MP50 (**T2M2**), sêmen congelado em Tris/Glicerol (**T3M1**), e sêmen congelado em MP50 (**T3M2**), totalizando 5 amostras.

#### **4.f) Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância levando-se em consideração o efeito animal e efeito tratamento: **T1** sêmen fresco; **T2M1** sêmen refrigerado em Tris/Glicerol; **T2M2** sêmen refrigerado em MP50; **T3M1** sêmen congelado em Tris/Glicerol; e **T3M2** sêmen congelado em MP50.

As médias de cada tratamento foram comparadas pelo Teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

## 5 ) RESULTADOS

Os resultados da análise de variância realizada encontram-se na tabela 2 e os resultados referentes às características funcionais e morfológicas das células espermáticas, submetidas a 3 condições (**T1, T2, T3**), encontram-se listados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Os resultados das perdas ocorridas de motilidade espermática e integridade de membranas, nas 3 condições estudadas (**T1, T2, T3**) e os 2 meios diluidores considerados (**M1 e M2**), encontram-se nas tabelas 5 e 6

As porcentagens médias dos resultados referentes à morfologia espermática nos 5 tratamentos (**T1, T2M1, T2M2, T3M1, T3M2**) estão representadas na figura 1.

As fotomicrografias de espermatozóides caninos submetidos a 3 condições (**T1, T2, T3**) e 2 meios diluidores (**M1 e M2**), estão representados nas figuras 2 e 3.

**Tabela 2:** Resultados da análise de variância (G.L: grau de liberdade e Q.M.: quadrado médio) referentes a motilidade espermática (Mot), vigor espermático, pH, teste hiposmótico (Hipo), integridade das membranas espermáticas (I.M.E.) e morfologia espermática (normais, maior e menor) de dez (10) ejaculados de cães submetidos a 5 tratamentos: sêmen fresco (**T1**), sêmen refrigerado em meio Tris/Glicerol (**T2M1**), sêmen refrigerado em meio MP50 (**T2M2**), sêmen congelado em meio Tris/Glicerol (**T3M1**), e sêmen congelado em meio MP50 (**T3M2**). Botucatu, SP, 2004.

	G.L	Q.M.							
		Mot	Vigor	pH	Hipo	I.M.E.	Normais	Maior	Menor
Animal	9	100,88	0,53*	0,18*	283,76*	239,72	370,764*	183,28*	71,23*
Tratamento	4	1168,25*	3,15*	0,59*	5641,94*	4460,64*	1581,48*	682,15*	204,03*
Residual	36	92,97	0,24	0,05	89,59	160,45	51,86	43,71	28,94

\* Significativo para  $p < 0,05$

**Tabela 3:** Média  $\pm$  desvio padrão da motilidade e vigor espermático, dos resultados do teste hiposmótico e do pH de 10 (dez) ejaculados de cães submetidos a três condições (**T1**, **T2** e **T3**), e dois meios diluidores: sêmen fresco (**T1**), sêmen refrigerado em meio Tris/Glicerol (**T2M1**), sêmen refrigerado em meio MP50 (**T2M2**), sêmen congelado em meio Tris/Glicerol (**T3M1**), e sêmen congelado em meio MP50 (**T3M2**). Botucatu, SP, 2004.

Tratamento	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Teste Hiposmótico (%)	pH
T1	89,5 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	4,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	82,9 $\pm$ 7,1 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
T2 M1	74,5 $\pm$ 8,3 <sup>b</sup>	3,6 $\pm$ 0,6 <sup>b,c</sup>	38,4 $\pm$ 14,5 <sup>b</sup>	6,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
T2 M2	77,0 $\pm$ 10,1 <sup>b</sup>	4,0 $\pm$ 0,6 <sup>a,b</sup>	63,3 $\pm$ 11,4 <sup>c</sup>	6,7 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
T3 M1	67,0 $\pm$ 13,2 <sup>b,c</sup>	3,3 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>	25,2 $\pm$ 7,1 <sup>d</sup>	6,4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
T3 M2	61,0 $\pm$ 10,7 <sup>c</sup>	3,3 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	34,1 $\pm$ 14,2 <sup>d</sup>	6,8 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>

\* Médias seguidas de letras diferentes, numa mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4:** Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados da integridade das membranas espermáticas (I.M.E.) e morfologia espermática de 10 (dez) ejaculados de cães submetidos a três condições (**T1**, **T2** e **T3**), e dois meios diluidores: sêmen fresco (**T1**), sêmen refrigerado em meio Tris/Glicerol (**T2M1**), sêmen refrigerado em meio MP50 (**T2M2**), sêmen congelado em meio Tris/Glicerol (**T3M1**), e sêmen congelado em meio MP50 (**T3M2**). Botucatu, SP, 2004.

Tratamento	I.M.E. (%)	Morfologia Espermática		
		Normais (%)	Maior (%)	Menor (%)
T1	82,7 $\pm$ 9,2 <sup>a</sup>	85,4 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	9,7 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	4,9 $\pm$ 2,4 <sup>a,b</sup>
T2 M1	42,3 $\pm$ 14,6 <sup>b</sup>	74,2 $\pm$ 11,5 <sup>b</sup>	19,1 $\pm$ 7,5 <sup>a,b</sup>	6,7 $\pm$ 6,2 <sup>b</sup>
T2 M2	65,9 $\pm$ 15,8 <sup>c</sup>	69,7 $\pm$ 15,0 <sup>b</sup>	20,5 $\pm$ 12,2 <sup>b</sup>	9,8 $\pm$ 6,5 <sup>b,c</sup>
T3 M1	33,3 $\pm$ 14,9 <sup>b</sup>	57,6 $\pm$ 8,6 <sup>c</sup>	27,2 $\pm$ 6,8 <sup>b,c</sup>	15,2 $\pm$ 6,3 <sup>c</sup>
T3 M2	37,7 $\pm$ 10,7 <sup>b</sup>	54,5 $\pm$ 11,4 <sup>c</sup>	32,5 $\pm$ 8,5 <sup>c</sup>	13,0 $\pm$ 5,7 <sup>c</sup>

\* Médias seguidas de letras diferentes, numa mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5:** Diferença entre os valores percentuais ajustados\* da motilidade espermática nos 5 tratamentos: sêmen fresco (**T1**), sêmen refrigerado em meio Tris/Glicerol (**T2M1**), sêmen refrigerado em meio MP50 (**T2M2**), sêmen congelado em meio Tris/Glicerol (**T3M1**), e sêmen congelado em meio MP50 (**T3M2**). Botucatu, SP, 2004.

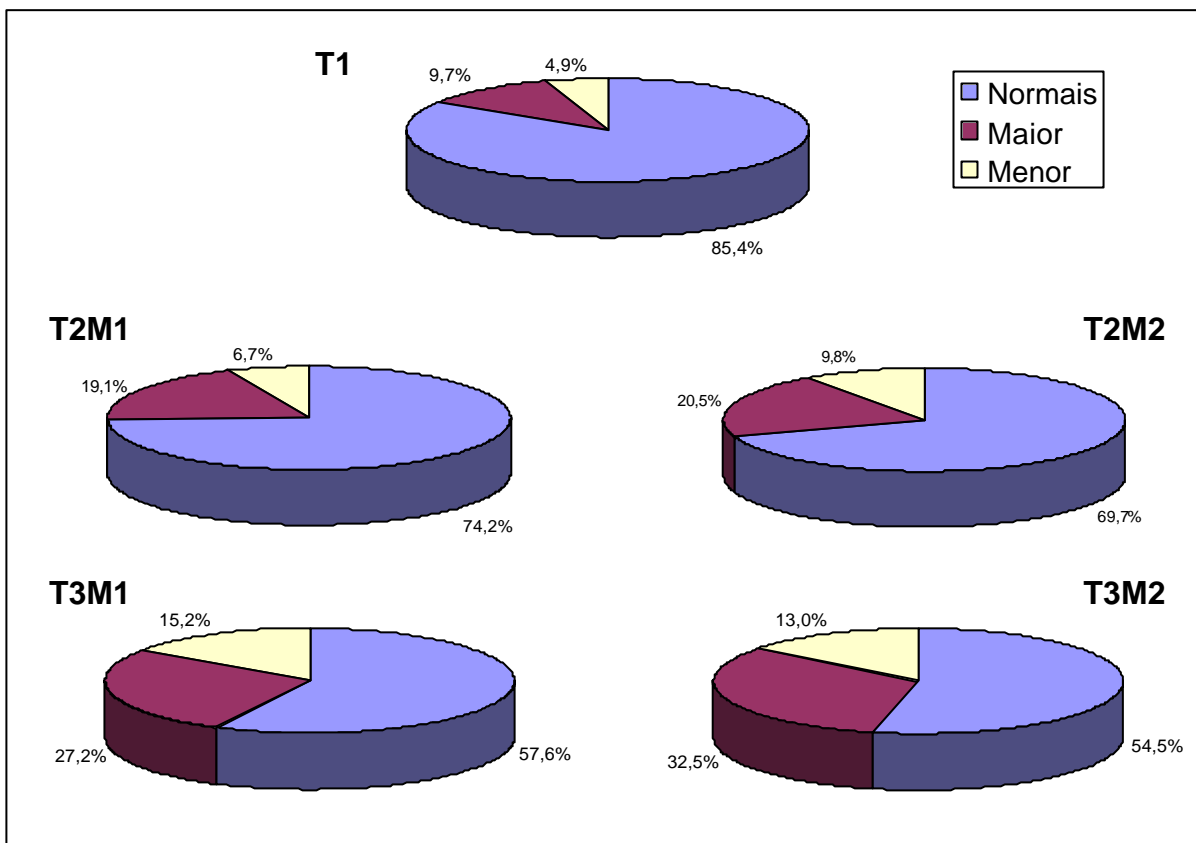
Linha ( $L_n$ ) Coluna ( $C_n$ )	T2M1 (74,5)	T2M2 (77,0)	T3M1 (67,0)	T3M2 (61,0)
T1 (89,5)	- 16,7%	- 13,9%	- 25,1%	- 31,8%
T2M1 (74,5)	--	+ 3,3%	- 10,0%	--
T2M2 (77,0)	--	--	--	- 20,7%
T3M1 (67,0)	--	--	--	- 8,9%

$$* Y = \left( \frac{L_n \times 100}{C_n} \right) - 100$$

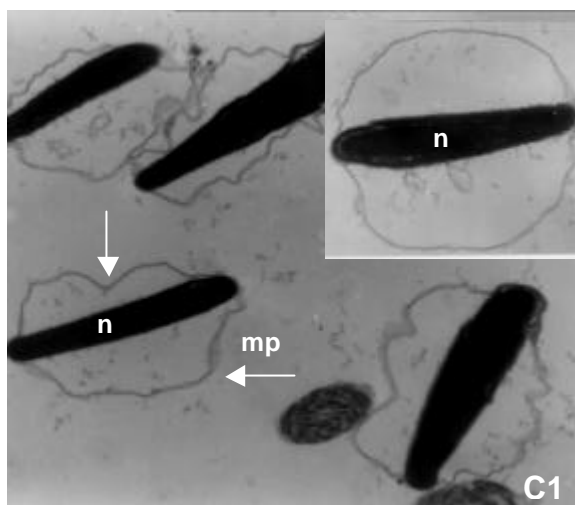
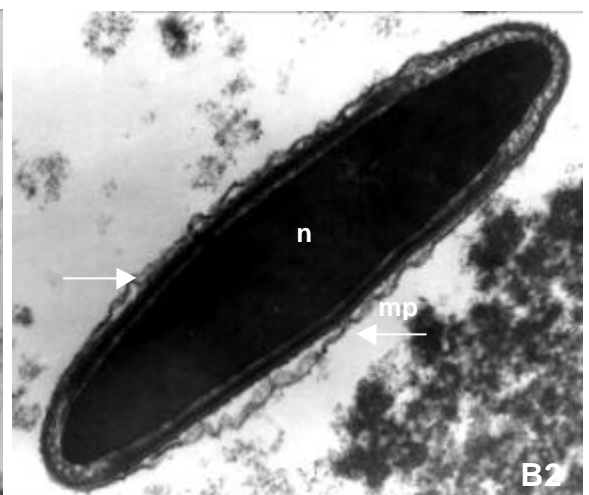
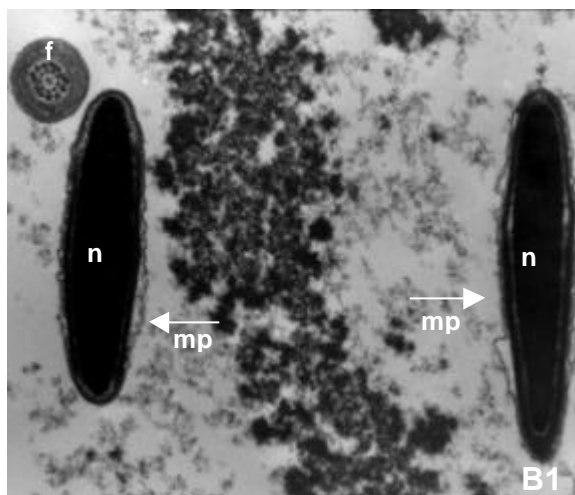
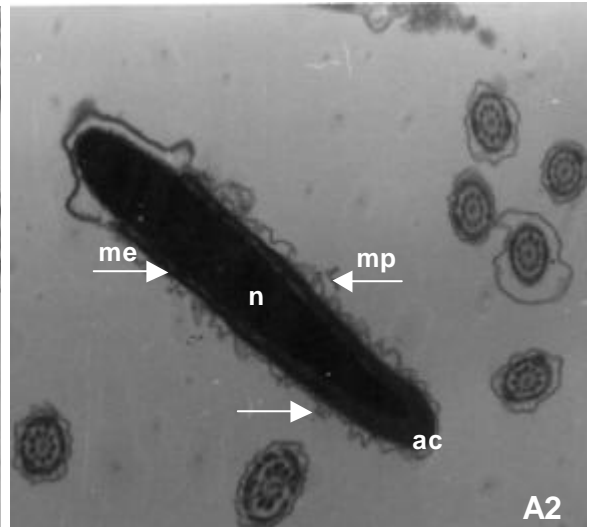
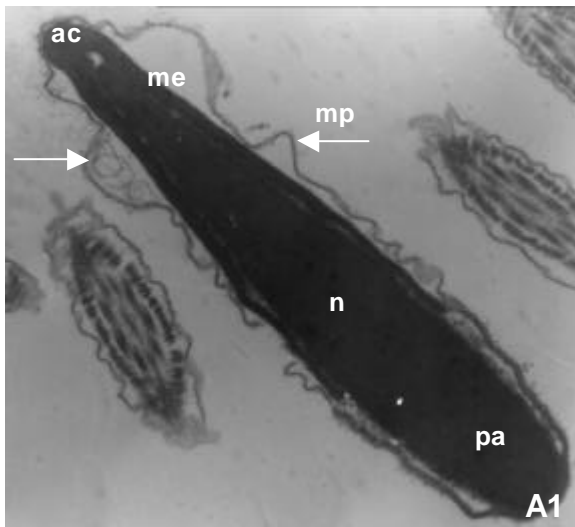
**Tabela 6:** Diferença entre os valores percentuais ajustados\* da integridade das membranas espermáticas nos 5 tratamentos: sêmen fresco (**T1**), sêmen refrigerado em meio Tris/Glicerol (**T2M1**), sêmen refrigerado em meio MP50 (**T2M2**), sêmen congelado em meio Tris/Glicerol (**T3M1**), e sêmen congelado em meio MP50 (**T3M2**). Botucatu, SP, 2004.

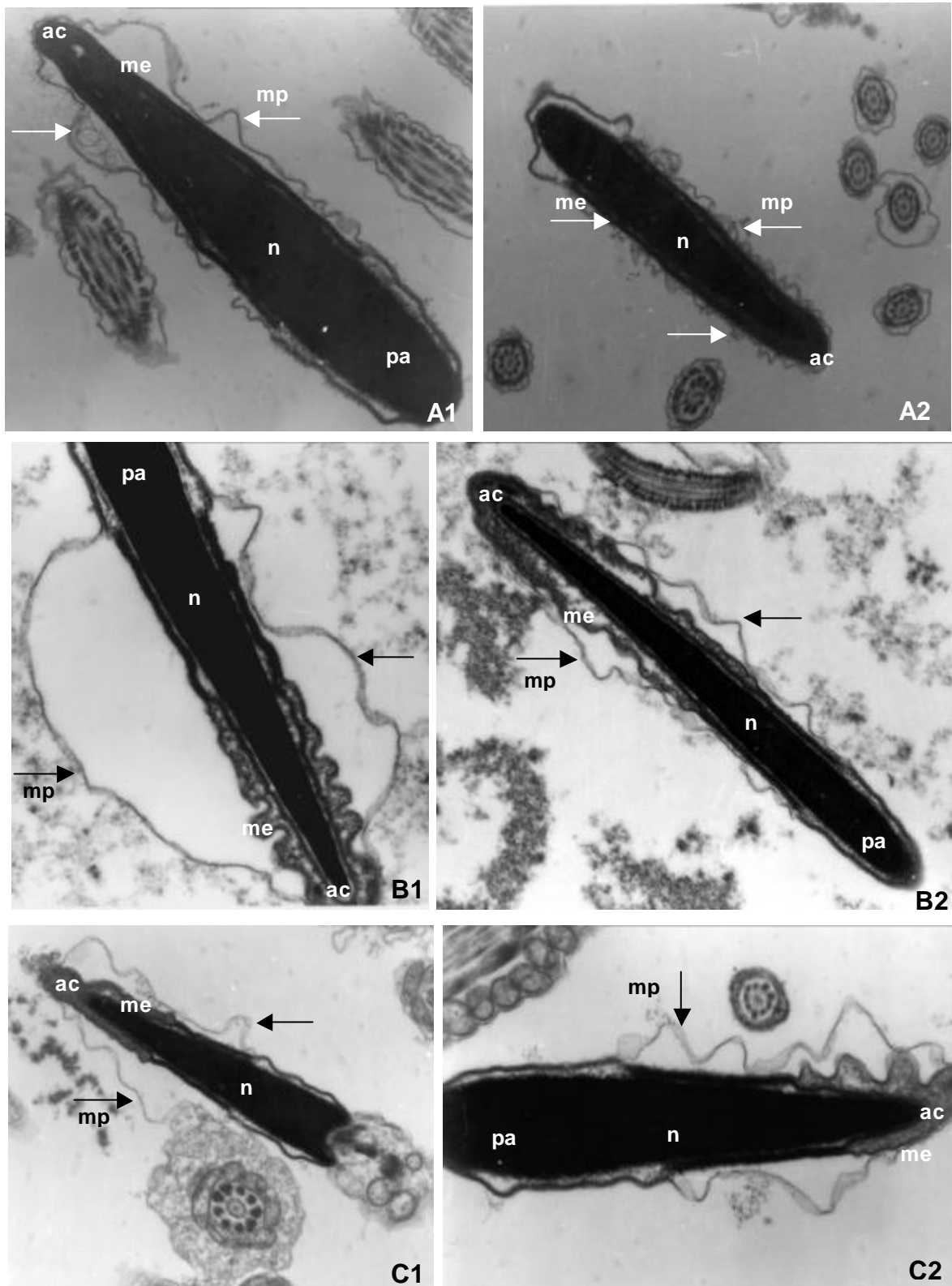
Linha ( $L_n$ ) Coluna ( $C_n$ )	T2M1 (42,2)	T2M2 (65,9)	T3M1 (33,3)	T3M2 (37,7)
T1 (82,7)	- 48,9%	- 20,3%	- 59,7%	- 54,4%
T2M1 (42,2)	--	+ 56,1%	- 21,0%	--
T2M2 (65,9)	--	--	--	- 42,7%
T3M1 (33,3)	--	--	--	+ 13,2%

$$* Y = \left( \frac{L_n \times 100}{C_n} \right) - 100$$



**Figura 1:** Porcentagens médias dos resultados da morfologia espermática - espermatozoides normais e com defeitos maiores e menores - nos tratamentos **T1** (sêmen fresco), **T2M1** (sêmen refrigerado em meio Tris/Glicerol), **T2M2** (sêmen refrigerado em meio MP50), **T3M1** (sêmen congelado em meio Tris/Glicerol) e **T3M2** (sêmen congelado em meio MP50). Botucatu, SP, 2004.





---

Em todos os tratamentos - **T1**, **T2M1**, **T2M2**, **T3M1**, **T3M2** – os espermatozóides caninos apresentaram edema e ondulações na membrana plasmática (Figuras 2 e 3). Não foi observada ruptura da membrana plasmática em nenhum dos tratamentos.

Os acrossomos apresentaram-se normais na condição de sêmen *in natura* - **T1** (Figura 2 - A1 e A2) e alterados nas condições de sêmen refrigerado - **T2M1** e **T2M2** – (Figura 2 – B1, B2, C1 e C2) e congelado - **T3M1** e **T3M2** – (Figura 3 - B1, B2, C1 e C2). Incluem-se como alterados: o edema e a ondulação da membrana acrossomal externa, com perda de conteúdo acrossomal. Não foi observada ruptura de membrana acrossomal em nenhum dos tratamentos.

## 6) DISCUSSÃO

Atualmente, muitos estudos de congelação de sêmen de cães estão sendo realizados com resultados promissores (PEÑA e LINDE-FORSBERG, 2000; BUENO, et al., 2001; SOARES et al., 2002; SILVA et al., 2002; SILVA et al., 2003), principalmente porque estão sendo levados em conta detalhes técnicos e características específicas da célula espermática canina.

A análise de variância efetuada nesse estudo, revelou influência do efeito animal sobre as variáveis analisadas, com exceção da motilidade espermática e integridade de membrana espermática. Esses resultados são decorrentes da variabilidade individual e racial, já descritas nos cães (MORTON e BRUCE, 1989, SOUZA et al., 1995; CHIRINÉA et al., 2003). A variabilidade individual e racial observada nesse experimento, é reforçada em outros estudos, sendo considerado um fator que dificulta a comparação de metodologia de congelação de sêmen e impede a comparação dos resultados quando se utilizam meios diluidores diferentes.

Os animais utilizados nesse experimento, apesar de serem de raças diferentes, todos se apresentavam em bom estado de saúde, com padrões mínimos de qualidade seminal, como observadas nas avaliações iniciais (Tabela 3 e 4- T1).

As colheitas de sêmen foram realizadas nos canis ou residências dos cães, para minimizar o estresse do transporte e a presença de pessoas estranhas, o que eventualmente poderia interferir com a colheita ou mesmo com a qualidade do ejaculado (FELDMAN e NELSON, 1996). Além disso, todas as colheitas foram realizadas sem a presença de fêmea em estro.

A célula espermática tem uma função principal, senão única, de fertilizar o ovócito, e para isso deve sofrer uma série de transformações seqüenciais no interior do aparelho genital feminino, que a tornam apta para exercer essa função. Na criopreservação o estresse sofrido pela célula espermática deve ser mínimo, para que sua função seja mantida (LINDE-FORSBERG, 2000; SANCHES et al., 2002; CARDOSO et al., 2002; SILVA et al., 2003). Nesse sentido, o tempo de transporte da amostra de sêmen até o laboratório foi de no máximo 10 minutos; para evitar os efeitos nocivos da luz e para manter a temperatura, o sêmen foi transportado num

frasco coletor introduzido numa garrafa térmica com água numa temperatura de 35°C. Procurou-se dessa maneira, diminuir os efeitos do transporte sobre o sêmen.

Nossos resultados de motilidade e vigor espermático, teste hiposmótico, integridade de membrana espermática (IME) e morfologia espermática, na condição **T1**, são semelhantes aos encontrados por Bueno et al. (2001); Soares et al. (2002); Silva et al. (2003); Souza (2003), e considerados dentro dos limites normais para a espécie.

### 6.a) Avaliação pós-refrigeração

A intenção de incluir uma avaliação morfofuncional dos espermatozoides após o período de equilíbrio (**T2**), foi de identificar e quantificar as perdas (Tabela 5 e 6) ocorridas na qualidade do sêmen até esta fase do processo de congelação.

Nesta fase, os resultados de motilidade espermática (Tabela 3) demonstraram uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o sêmen *in natura* (**T1**) e após o equilíbrio (**T2**) nos 2 meios considerados (**M1 e M2**), porém não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os meios (**T2M1 e T2M2**); mas a perda percentual da motilidade espermática (Tabela 5) foi maior (16,7%) no **M1** e menor (13,9%) no **M2**.

Essa perda menor no **T2M2** pode ser devido a uma menor concentração de glicerol (3% x 8%) no meio MP50, ou também pode ser devida à associação de 2 crioprotetores intracelulares (3% de glicerol + 2% de dimetil-formamida) (PAPA\*) na composição desse meio. O meio MP50 (**M2**) também possui componentes à base de leite em pó desnatado, gema de ovo e uma variedade de açúcares (lactose, glicose e rafinose), que são substâncias conhecidas por protegerem a membrana plasmática da diminuição de temperatura. Isto poderia explicar os melhores resultados obtidos pelo meio MP50 (**M2**) nessa fase.

Em relação ao vigor espermático o **T2M2** também se mostrou superior quando comparado com o **T2M1**. Provavelmente, o meio MP50, é um meio mais enriquecido quando comparado ao Tris/Glicerol, preservando melhor as características de movimento da célula espermática.

Quanto ao teste hiposmótico, o **T2M2** demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao **T2M1**. O teste hiposmótico é uma avaliação funcional e que

---

\* Papa, F.O. (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Câmpus de Botucatu) Comunicação pessoal, 2003.

caracteriza a capacidade de transporte seletivo de moléculas através da membrana plasmática (KUMI-DIAKA, 1993). Ainda que nesta fase (**T2**) as células espermáticas não estejam congeladas, elas já se encontram diluídas nos meios diluidores hiperosmóticos, e a manutenção da capacidade funcional das células é de extrema importância para a continuidade do processo de congelamento.

Em relação à manutenção do pH, o **T2M1** não mostrou diferença significativa comparado com o sêmen *in natura* (**T1**), demonstrando assim que o meio contendo o tampão Tris foi adequado para manter o potencial iônico do meio. O meio MP50 apresentou pH entre 6,9 e 7,0 antes de ser adicionado ao *pellet* espermático, e portanto, na condição **T2M2** houve uma diminuição de 0,2, mas ainda assim mantendo um potencial iônico adequado e dentro dos limites para a espécie.

Nos resultados de integridade de membrana plasmática (IME) verificou-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre **T1** e **T2** e entre **T2M1** e **T2M2** com superioridade do **T2M2** em relação ao **T2M1**. Na tabela 6, na condição **T2**, é possível observar uma superioridade do meio MP50 em relação ao Tris/Glicerol, com um ganho de +56,1%.

Nesse ponto, temos que considerar que a concentração ótima de glicerol adicionada ao meio é um equilíbrio entre seus efeitos tóxicos e seu efeito crioprotetor. No meio MP50 o glicerol encontra-se numa porcentagem de 3% e seus efeitos tóxicos não são sentidos, e como a temperatura nessa fase está por volta de 5°C, os seus efeitos crioprotetores ainda não foram totalmente necessários. Já o meio Tris/Glicerol, com 8% de glicerol entre seus componentes, foi provavelmente mais tóxico para a célula espermática, e é responsável, pelo menos em parte, pelos resultados inferiores obtidos nesse diluidor durante essa fase. A dimetil-formamida incluída no meio MP50 é um crioprotetor pouco utilizado em cães, podendo também, neste caso, ser considerado um fator benéfico, protegendo os espermatozoides da diminuição de temperatura.

Tanto o teste hiposmótico como a análise de IME avalia a integridade e funcionalidade das membranas espermáticas, e nesses 2 testes o meio MP50, após a fase de refrigeração e equilíbrio (**T2**), foi consideravelmente superior ao Tris/Glicerol, permitindo que a amostra diluída e refrigerada com esse meio fosse congelada com uma população de células espermáticas mais viáveis.

Durante a refrigeração (**T2**), as alterações estruturais da célula espermática apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparadas com sêmen *in*

*natura*, e essa diferença foi devido principalmente a um aumento do percentual de defeitos maiores, que no **T2M1** foi de 9,4% e no **T2M2** de 10,8%. A análise individual dessa variável mostrou um aumento principalmente de defeitos de acrossomo, responsáveis por esses resultados (Apêndice B).

A curva de refrigeração utilizada nesse experimento foi de aproximadamente 1,7°C/minuto, desde que as amostras atingiram a temperatura de refrigeração (5°C) após 12 minutos de sua introdução no refrigerador programado (25°C – 5°C). Esta é uma curva de refrigeração considerada rápida quando comparada à maioria dos trabalhos que descrevem curvas de refrigeração mais lentas (BUENO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 1999).

Outro fator a ser considerado é a associação do meio diluidor com a curva de refrigeração e período de equilíbrio utilizados nesse experimento. Provavelmente, o meio MP50, devido à associação de crioprotetores, a sua composição, e a curva de refrigeração utilizada, conferiu melhor proteção aos espermatozóides contra a diminuição da temperatura.

Quanto à análise ultra-estrutural, vale ressaltar as lesões causadas na membrana plasmática pelo processamento das amostras durante a fixação. Lesões observadas na figura 2 (A1 e A2) mostram a membrana plasmática edemaciada, o que pode ser consequência apenas do procedimento de fixação das amostras pelo glutaraldeído (LANDIN-ALVARENGA\*)

A figura 2 (B1/B2 e C1/C2) mostra as alterações decorrentes do processo de refrigeração, evidenciando edema da membrana plasmática mais pronunciado no meio MP50 (C1) do que no meio Tris/Glicerol (B2). Nessa etapa do processo, as membranas acrossomais mantiveram-se íntegras.

O conjunto de testes selecionados para avaliação da etapa de refrigeração do sêmen, demonstrou que o meio MP50 foi superior no teste hiposmótico e IME, a despeito de um edema de membrana plasmática muito pronunciado, visto na MET

Olar et al. (1999), relataram que o espermatozóide canino suporta uma certa variação de temperatura nos períodos de refrigeração e equilíbrio, sem que essa variação tenha qualquer efeito prejudicial sobre a motilidade espermática antes da criopreservação. Contudo, Quinn et al. (1980) e Watson (1995), afirmaram que o

---

\* Landin-Alvarenga, F.C. (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Câmpus de Botucatu)  
Comunicação pessoal, 2003.

choque térmico é mais evidente na faixa de 12°C a 0°C; os resultados obtidos nesse experimento, até essa etapa do processamento de sêmen (5°C), foram satisfatórios, mostrando que a curva de refrigeração imposta foi eficiente para minimizar os efeitos do choque térmico.

### **6.b) Avaliação Pós-Descongelção**

No presente estudo, o sêmen foi descongelado numa temperatura de 70°C por 8 segundos, levando-se em consideração a diminuição dos riscos de recristalização de microcristais intracelulares, que podem ocorrer num processo de descongelção lenta (OLAR, 1994; IVANOVA – KICHEVA et al., 1995; PEÑA, 2000).

A média da porcentagem de motilidade espermática após a descongelção, foi de 67% no meio Tris/Glicerol, com uma variação de 40% a 80%; no meio MP50 a motilidade espermática foi de 61%, com variação de 50% a 75%. Os valores de motilidade para o sêmen canino descongelado, usando diluidor com glicerol variam entre 30% a 70% (FOOTE, 1964, PLATZ e SEAGER, 1977, PROVINCE et al., 1984, HAY et al., 1997). Embora os valores do presente trabalho sejam semelhantes aos encontrados por esses autores, cabe destacar que diferenças relacionadas aos componentes do diluidor e aos métodos de congelação e descongelção dificultam as comparações entre os diferentes trabalhos. Não existe na literatura consultada resultados referentes a motilidade espermática de sêmen canino descongelado utilizando-se diluidores a base de dimetil-formamida ou associação de glicerol e dimetil-formamida.

Os valores de vigor espermático pós-descongelção não diferiram entre os meios estudados, mas mostraram uma diferença significativa entre o **T2** e **T3** apenas para o meio MP50. Porém, o meio Tris/Glicerol apresentou melhores resultados na manutenção do vigor espermático pós-descongelção.

No teste hiposmótico, os resultados do sêmen descongelado não mostraram diferença significativa entre os 2 meios utilizados, mas foi grande e significativa a diferença entre as etapas de refrigeração e congelação nos dois meios estudados.

Em relação ao pH, o meio Tris/Glicerol manteve-se constante durante todo processo de congelação, demonstrando eficiência no seu sistema tampão. Houve uma queda do pH inicial no meio Tris/Glicerol (de 6,7 para 6,3) quando foi adicionado as células espermáticas, o que era esperado devido ao metabolismo

celular com acúmulo de íons  $H^+$  no meio; em seguida com a diminuição de temperatura, o metabolismo também se reduziu, diminuindo a deposição dos produtos tóxicos.

Na avaliação da IME pós-descongelamento, os 2 meios se comportaram igualmente, mas houve uma queda de 42,7% (Tabela 6) entre a etapa de refrigeração e de congelamento no meio MP50. Esse resultado foi surpreendente e mostrou um contra senso em relação à etapa de refrigeração. O meio MP50, talvez, pela baixa porcentagem de glicerol em sua composição, não protegeu convenientemente a membrana plasmática dos danos causados pelo processo de congelamento. Com a diminuição de temperatura ( $5^{\circ}C$  para  $-196^{\circ}C$ ) ocorreram danos severos na integridade da membrana espermática das células diluídas nesse meio.

Neste caso, o Tris/Glicerol, apesar de ser um diluidor de composição mais simples, foi mais eficiente na proteção das membranas espermáticas na etapa de congelamento, muito provavelmente, devido à porcentagem de glicerol (8%) utilizado, que mostrou toxicidade durante a refrigeração, mas exerceu seus efeitos crioprotetores na congelamento.

O ejaculado inicial (**T1**) apresentou aproximadamente 85% de células morfolologicamente normais. Após o processo de congelamento as amostras mantiveram cerca de 65% de células ainda morfolologicamente normais, o que se constitui um bom resultado. As perdas maiores foram representadas pela porcentagem de defeitos maiores, principalmente defeitos de acrossomo da mesma maneira que na etapa de refrigeração.

Os resultados de IME e defeitos de acrossomo, vistos nesse experimento, são decorrentes de danos nas membranas celulares dos espermatozoides, provavelmente, causados por mudanças na configuração dos constituintes dessas membranas, durante todo processo de congelamento (PARKS et al., 1997; MEDEIROS et al., 2002).

As lesões de IME e alterações acrossomais observadas no espermatozoide após a descongelamento nos 2 meios diluidores utilizados, são compatíveis com a descrição da análise ultra-estrutural, vistas na figura 3 (B1/B2 e C1/C2). Foi observado na análise ultra-estrutural edema e ondulações das membranas plasmáticas e membranas acrossomais externas, o que pode ocasionar a perda do conteúdo acrossomal, inviabilizando a célula espermática. Apesar das lesões

descritas, não foram identificadas rupturas das membranas plasmáticas e acrossomais externa, nem vesiculações sugestivas de reação do acrossomo.

Temos que considerar que a análise ultra-estrutural foi apenas descritiva e não quantitativa como a avaliação da integridade da membrana por sondas fluorescentes.

Os testes selecionados para avaliação morfofuncional das células espermáticas nesse experimento, mostraram-se sensíveis, identificando as células íntegras e alteradas, possibilitando uma avaliação precisa. Seria interessante e conveniente a realização de testes de correlação entre esses resultados, e resultados de inseminação artificial ou ensaios de penetração espermática.

Tanto a inseminação artificial como os testes de penetração espermática, ainda não se constitui em uma rotina na reprodução de pequenos animais, mas seriam as avaliações mais efetivas para avaliar amostras de sêmen congeladas.

Na literatura consultada existem vários trabalhos sobre congelação de sêmen de cão utilizando diferentes meios diluidores, com porcentagem variadas de glicerol, tampões diversos e diferentes fontes de energia, o que impossibilita e dificulta uma comparação segura entre os resultados.

O objetivo desse estudo em utilizar 2 meios diluidores, foi comparar um meio considerado padrão para espécie canina, o Tri/Glicerol, com um meio comercial utilizado normalmente para espécie equina com bons resultados (MP50).

Na última década houve um crescimento significativo na literatura relacionada à reprodução de cães, aumentando nossos conhecimentos tanto da biologia reprodutiva como das biotécnicas aplicadas a essa espécie. Os resultados de congelação de sêmen de cão conseguidos hoje são superiores aos descritos a 10 anos atrás, principalmente porque os estudos atuais tem caracterizado particularidades da célula espermática canina, curvas de refrigeração e congelação específicas para cães, e meios diluidores apropriados.

## 7) CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que:

- 1) Os testes selecionados para avaliação morfofuncional das células espermáticas caninas submetidas ao estresse da congelação mostraram-se adequados.
- 2) A análise comparativa entre os 2 (dois) meios diluidores utilizados (Tris/Glicerol e MP50), por meio da caracterização morfofuncional das células espermáticas caninas **pós-refrigeração**, demonstrou uma superioridade do meio MP50 sobre o Tris/Glicerol.
- 3) A análise comparativa entre os 2 (dois) meios diluidores utilizados (Tris/Glicerol e MP50), por meio da caracterização morfofuncional das células espermáticas caninas **pós-descongelação**, demonstrou uma igualdade entre os meios Tris/Glicerol e MP50.

## 8 ) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **J. Androl.**, v.10, p. 89-98, 1989.

BATTISTA, M.; PARKS, J.; CONCANNON, P. Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, Tris or Test extenders. **Anim. Reprod. Sci.**, v.3, p.229-231, 1989.

BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; VALENTIM, F.M. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. II – Efeito do protocolo de refrigeração. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.3, p.372-379, 2001.

BURGESS, C.M.; BREDL, J.C.S.; PLUMMER, J.M.; ENGLAND, G.C.W. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. **J. Reprod. Fétil.**, v.57, p.357-363, 2001.

CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco. **Rev. Ciênc. Rural**, v.32, n.4, p.657-661, 2002.

CHACUR, M.G. **Avaliação da congelação de sêmen bubalino *Bubalus bubalis*, com os diluidores glicina-gema, triladyl e Tes em diferentes tempos de equilíbrio.** 1996. 117p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F. F.; TEBET, J.M.; LOPES, M.D.; TRINCA, L.A. Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.  
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database.** Philadelphia, 1996. 468p.

congelamento de sêmen de cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, n.3, p.361-363, 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. (Ed). **Current veterinary therapy X**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989. p.1247-1258.

CUNHA, I.C.N. **Criopreservação do sêmen de cães**. 2002. 149p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D. Efeitos da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, p.306-307, 1999.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D.; ZUCCARI, C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Proceedings...** Mato Grosso: Brasil, 1996. p.411.

DAVIES, P.R. **A study of spermatogenesis, rates of sperm production, and methods of preserving the semen of dogs**. 1982. PhD. Thesis, University of Sidney, Australia.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes – a demonstration using sperm as a model. **J. Exp. Zool.**, v.265, p.432-437, 1993.

ENGLAND, G.; ALLEN, W. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. I. Potential influences during processing for artificial insemination. **Theriogenology**, v.37, p.363-371, 1992.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.243-255, 1993.

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

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. 785p.

FONTBONNE, A.; BADINAND, F. Studies on freezing dog spermatozoa. Effect of glycerol on motility after thawing. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.531-532, 1993.

FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. **Am. J. Vet. Res.**, v.25, p.32-36, 1964.

FOOTE, R.H.; LEONARD, E.P. The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. **Cornell Vet.**, v.54, p.78-89, 1964.

FRASER, L.R. Mouse sperm capacitation "in vitro" involves loss of a surface associated inhibitory component. **J. Reprod. Fertil.**, v.72, p.373-384, 1984.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. 649p.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **J. Androl.**, v.11, p.73-88, 1990.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p.343-352, 1990.

HAY, M. A.; KING, W.A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Effects of cooling, freezing, and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.51, p.99-108, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. **Anim. Reprod. Sci.**, v.51, p.321-332, 1998.

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

HOLT, W.V. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. **Int. Rev. Cytol.**, v.87, p.159-194, 1984.

HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing – observations with experimental cryomicroscopy. **Biol. Reprod.**, v.46, p.1086-1094, 1992.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.51, p.414-424, 1994.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. Validation of sperm quality analyser (SQA) for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.1143-1158, 2001.

INAMASSU, A.; UECHI, E.; LOPES, M.D. Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, p.302-304, 1999.

IVANOVA-KICHEVA, M.G.; SUBEV, M.S.; BOBADOV, D.P.; ROUSEVA, I.A. Effects of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.563-569, 1995.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars. Vet.**, v.10, p.156-165, 1994.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ; CRABO, B.G. ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, v.47, p.219-228, 1984.

JOHNSTON, S. D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.21, p.545-551, 1991.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OSLON, P.N.S. Semen collection, evaluation and preservation. In: \_\_\_\_\_. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. cap.16, p.287-306.

KRAUSE, D. **Untersuchungen am bullensperma unter berücksichtigung der fertilitäts diagnostis chen bedeutung der befunde**. Hannover, 1966. 165p. Tese (Livre Docência) – Tierärztliche Hochs Chule, Hannover.

KUM-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, p.1279-1289, 1993.

KUM-DIAKA, J.; BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro biossay for canine semen. **Theriogenology**, v.41, p1355-1366, 1994.

LIN, D.S.; CONNOR, W.E.; WOLF, D.P.; NEURINGER, M.; HACHEY, D.L. Unique lipids of primate spermatozoa – desmosterol and docosahexaenoic acid. **J. Lipid Res.**, v.34, p.491-499, 1993.

LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Fertily in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.39, p.299-310, 1989.

LOVELOCK, J.E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochem. J.**, v.58, p.618-622, 1954.

MANN, T. **The biochemistry of semen and of the reproductive male tract**. 2.ed. London: Methuen, 1964. 240p.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J. Physiol.**, v.247, p. C125-142, 1984.

MCGEE, H.A.; MARTIN, W.J. Cryochemistry. **Cryogenics**, v.2, p.1-11, 1962.

MEDEIROS, A.S.L. **Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões**. 2003. 106p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, A.T.D.; OLIVEIRA, J.L.; RODRIGUES, J.R. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. **Proceedings...**Paraná: Brasil, 2002. p. 327-344.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial, inseminação artificial nos cães**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 750p.

MORTON, D.B.; BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **J. Reprod. Fertil.**, v.39, p.311-316, 1989.

MOURA, C.S.; CAVALCANTI, M.C.O.; GUERRA, M.M.P.; TAVARES, P.T.S. Criopreservação de sêmen canino utilizando diferentes métodos de refrigeração. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, n.3, p.304-306, 1999.

NÖTHLING, J.O.; VOLKMANN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v.66, p.49-55, 1995.

OETTLE, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.257-260, 1993.

OLAR, T.T. **Cryopreservation of dog semen.** PhD Thesis, Colorado State University, 1984.

OLAR, T.T.; BOWEN, R.A.; PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.31, p.451-461, 1989.

OLIVEIRA, J.V.L.; BARRETO, C.S.; FILHO, A.L.R. Avaliação de sêmen canino pós-descongelamento utilizando-se tris-gema e lactose-gema em quatro diferentes períodos de equilíbrio. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, n.3, p.308-309, 1999.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; BICUDO, S.D.; LOPES, M.D.; RAMIRES, P.R.N. Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Sthyphnodendrum barbatiman*). In: CONGRESSO DE BIOLOGIA CELULAR, 5., 1986, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1986. p.86.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, n.3, p.184-186, 2002.

PARKS, J.E. Hypothermia and mammalian gametes. In: KAROW, A.M, CRITSER, J.K. (Eds.) **Reproductive tissue banking.** San Diego: Academic Press, 1997. p.229-261.

PEÑA, A. **Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion-descongelacion.** Santiago de Compostela: España, 1997. 329p. Tesis Doctoral – Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of equex one or two dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-875, 2000.

PEÑA, A.I. **Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity**. Doctoral thesis, Uppsala, 2000. Universidad de Santiago de Compostela.

PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-174, 1998.

PLATZ, C.C.; SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Lab. Anim. Sci.**, v.27, p.1013-1016, 1977.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKS, A.S. A revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, v.164, p.666, 1949.

PROVINCE, C. A.; AMANN, R. P.; PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**, v.22, p. 409-415, 1984.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **J. Reprod. Fertil.**, v.60, n.2, p.403-407, 1980.

RENTON, J.P.; HARVEY, M.J.A.; HARKER, S. A spermatozoal abnormality in dogs related to infertility. **Vet. Rec.**, v.118, p.429-430, 1986.

RIGAU, T.; CAMPRUBI, M.; BADIA, J.; BALLESTER, J.; JESUS PALOMO, M.; RIVERA, M.; IZQUIERDO, D.; PEÑA, A.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. Different effects of glucose and fructose on energy metabolism in dog sperm from fresh ejaculates. In:

INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, **Proceedings...** Stockholm: European Society for Study of Reproduction, 2000. p. 24.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EKWALL, H.; LINDE-FORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen spermatozoa. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.279-285, 1993.

ROTA, A. **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa.** 1998, p.1-42. Thesis (Doctoral) - Uppsala Sweden: SLU Service/Reprod.

ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J.; ROMAGNOLI, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. **Reprod. Domest. Anim.**, v.33, p.355-361, 1998.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. **Theriogenology**, v.44, p.885-900, 1995.

ROWSON, L.E.A. Infertility of cow, sow and bitch. **Ir. Vet. J.**, v.8, p. 216-221, 1954.

SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N.L.; LODGE, J.R. Principles and techniques of freezing spermatozoa. **Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle.** 2.ed. São Francisco: Freeman and Company, 1978. p. 494-554.

SANCHEZ, A.; RUBILAR, J.; GATICA, R. Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. **Arch. Med. Vet.**, v.34, n.1, p.131-134, 2002.

SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. **A. I. Digest.**, v.17, p.6-7, 1969.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. **Rev. Ciênc. Rural**, v.30, n.6, p.1021-1025, 2000.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **Vet. J.**, v.164, p.244-246, 2002.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v.59, p.821-829, 2003.

SILVA, K.M.G. **Efeito dos antibióticos gentamicina e cefalotina e do aminoácido taurina em meio de gema de ovo (BAKEN) e meio de leite desnatado (KENNEY), sobre a longevidade e fertilidade do sêmen resfriado de equino.** 2001. 108p. Tese (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B.; VERSTEGEM, J.P. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Vet. Rec.**, v.138, p.154-157, 1996.

SILVA, L.D.M.; VERSTEGEM, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.571-579, 1995.

SMITH, F.O.; GRAHAM, E.F. Cryopreservation of canine semen: Techniques and performance. In: 10th INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION, 1984, Champaign-Urbana. **Proceedings...**1984. v.2, p.216.

SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A.; CECIM, M. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Rev. Ciênc. Rural**, v.32, n.4, p.649-655, 2002.

SOUZA, F.F. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino.** 2003. 98p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SOUZA, J.A.T.; SPICCIATI, W.; VISINTIN, J.A.; BARNABÉ, V.H.; BARNABÉ, R.C. Características seminais de cães da raça Pastor Alemão. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.32, n.3, p.181-186, 1995.

STROM HOLST, B.; ROTA, A.; ANDERSEN BERG, K.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation content of selected elements. **Reprod. Domest. Anim.**, v.33, p.77-82, 1998.

THIRUMALA, S.; FERRER, M.S.; AL-JARRAH, A.; EILTS, B.E.; PACCAMONTI, D.L.; DEVIREDDY, R.V. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. **Cryobiology**, v.47, n. 2, p.109-124, 2003.

THOMAS, P.G.A.; LARSEN, R.E.; BURNS, J.M.; HAHN, C.N. A comparison of three packing techniques using two extenders for the Cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v.40, p.1199-1205, 1993.

THRELFALL, W. R. Semen collection and evaluation. In: KUSTRITZ, M.V.R. **The practical veterinarian: Small Animal Theriogenology**. Elsevier Science, USA, 2003. p.97-124.

VAN DEN BERG, L.; ROSE, D. Effects of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$ . **Arch. Biochem. Biophys.**, v.81, p.319-329, 1959.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. **Proceedings...**Paraná: Brasil, 2002. p. 149-179.

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

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of sperm and assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 871-892, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci**, v.60/61, p.481-492, 2000.

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. **Rev. Reprod. Biol.**, v.1, p.283-350, 1979.

WATSON, P.F. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing. **J. Therm. Biol.**, v.1, p.137-141, 1976.

WILSON, M.S. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.307-311, 1993.

ZUCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina.** 1998. 121p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

**A:** Resultados individuais referentes à análise morfofuncional de amostras de sêmen *in natura* (**T1**), refrigerado (**T2**) e congelado (**T3**) em dois meios diluidores (**M1** – Tris/Glicerol e **M2** – MP50) de 10 cães adultos. Botucatu, SP, 2004.

Tratamento	Animal	Mot (%)	Vigor(0-5)	pH	Hipo (%)	Fluo (%)	Normais (%)	Maior (%)	Menor (%)
<b>T1</b>	1	85	4	6,1	87,5	81,5	78	13	9
	2	85	4,5	6,1	72	83,5	88,5	9	2,5
	3	90	5	6,1	89,5	62,5	86,5	7,5	6
	4	90	5	6,1	88,5	88,5	90	6,5	3,5
	5	85	3,5	6,1	81,5	85	87	8,5	4,5
	6	95	5	6,1	79	91	84,5	8,5	7
	7	95	5	6,5	91	92,5	91	6	3
	8	90	5	6,5	89	90,5	80	16	4
	9	90	4,5	6,1	77	76,5	82,5	9,5	8
	10	90	4,5	6,1	74	75,5	86	12,5	1,5
<b>T2M1</b>	1	70	3	6,5	54	56,5	51	28,5	20,5
	2	80	4	6,1	25,5	45	67	23	10
	3	85	5	6,5	65	58	88,5	9,5	2
	4	75	3,5	6,1	44	28	69	31	0
	5	65	3	6,8	49,5	44,5	76	19,5	4,5
	6	80	3,5	6,1	19,5	28	67	22	11
	7	70	3	6,1	37,5	37	80	13	7
	8	85	3,5	6,1	26,5	25,5	79,5	19	1,5
	9	60	3,5	6,1	34	67,5	90	8,5	1,5
	10	75	4	6,8	28	32,5	74	17	9
<b>T2M2</b>	1	65	3	6,8	77	80,5	46,5	31	22,5
	2	80	5	6,5	74,5	79,5	66,5	18,5	15
	3	80	4	6,1	74,5	70,5	85	10	5
	4	80	4	6,8	66	78,5	76,5	21,5	2
	5	60	3,5	7,1	61	46,5	81	16	3
	6	85	4	6,8	51,5	60,5	41	49,5	9,5
	7	90	5	6,5	75	72	73	11	16
	8	85	4	6,8	52,5	44,5	74	21	5
	9	80	4	6,1	52	82,5	84	7,5	8,5
	10	65	3,5	7,1	49	44	69	20	11
<b>T3M1</b>	1	70	3	6,5	27	58,5	49	36	15
	2	70	3	6,1	32,5	19,5	65	19	16
	3	80	4,5	6,8	33,5	60,5	71	18,5	10,5
	4	40	2,5	6,1	15,5	16	49,5	24,5	25
	5	75	3,5	6,8	24	25	64,5	22,5	13
	6	60	3	6,5	13	30,5	52	37	11
	7	50	3	6,1	24,5	29	56	27	17
	8	80	3,5	6,1	26,5	31	57	35,5	10,5
	9	70	3,5	6,1	33,5	34,5	66	26,5	7,5
	10	75	3	6,8	22	28,5	46	27,5	26,5
<b>T3M2</b>	1	60	3,5	6,8	46,5	35	34,5	50,5	15
	2	75	4	6,8	59	39,5	52	36	12
	3	50	3	6,5	21	46,5	68	21	11
	4	70	3	6,5	32	12	55,5	34	10,5
	5	60	3	7,1	44	38,5	72	23	5
	6	50	3	6,8	9	51,5	49,5	36	14,5
	7	70	4	6,8	38	42	52	36	12
	8	75	3,5	6,8	28	42,5	47,5	35,5	17
	9	50	3	6,5	37	39	67	26,5	6,5
	10	50	3	7,1	26	30,5	47,5	27	25,5

**B:** Resultados médios da avaliação morfológica de amostras de sêmen *in natura* (T1), refrigeradas (T2) e congeladas (T3) em 2 meios diferentes, de 10 cães adultos. Botucatu, SP, 2004.

TRATAMENTOS	T1	T2		T3	
		TRIS	MP50	TRIS	MP50
<b>Defeitos Menores (%)</b>					
Cabeça solta normal	0,20	0,40	0,70	0,10	0,20
Cabeça pequena normal	0,20	--	0,10	--	0,10
Cabeça gigante	0,30	--	0,10	0,20	0,30
Inserção abaxial	--	0,20	0,10	--	--
Inserção oblíqua	0,50	0,30	0,40	0,60	0,70
Inserção retro-axial	--	0,45	0,40	--	0,10
Cauda enrolada	1,70	2,90	4,10	8,40	6,40
Cauda dobrada	1,50	2,40	3,40	5,60	4,60
Gota citoplasmática distal	0,50	0,10	0,50	0,30	0,60
<b>Defeitos Maiores (%)</b>					
Cabeça estreita na base	0,30	0,30	0,50	--	0,15
Cabeça piriforme	0,60	0,40	0,20	--	0,25
Contorno anormal	0,20	1,80	1,20	2,00	1,85
Cabeça solta anormal	0,20	0,20	1,10	0,10	0,45
Cabeça sub-desenvolvida	0,20	0,50	0,40	0,10	0,05
Formas duplas	0,20	0,20	0,50	0,40	0,25
Acrossomo	1,10	8,00	7,30	11,50	16,65
Peça intermediária	1,70	2,50	3,70	3,90	3,90
Cauda fortemente dobrada	2,40	1,30	1,90	4,50	3,90
Cauda fortemente enrolada	2,10	2,80	2,80	3,00	4,30
Fratura total da cauda	--	0,20	0,20	0,90	--
Gota citoplasmática proximal	0,40	0,50	0,30	0,40	0,40
Outros:	0,30	0,40	0,40	0,40	0,35
<b>NORMAIS (%)</b>	<b>85,40</b>	<b>74,20</b>	<b>69,70</b>	<b>57,60</b>	<b>54,50</b>
<b>Total Defeitos Maiores (%)</b>	<b>9,70</b>	<b>19,10</b>	<b>20,50</b>	<b>27,20</b>	<b>35,50</b>
<b>Total Defeitos Menores (%)</b>	<b>4,90</b>	<b>6,70</b>	<b>9,80</b>	<b>15,20</b>	<b>13,00</b>

## RESUMO

Com o objetivo de se avaliar dois meios diluidores - Tris/Glicerol e MP50 – para a congelação do sêmen de cães, foram utilizados ejaculados de 10 cães adultos, colhidos por meio de manipulação digital. As características morfofuncionais foram analisadas no sêmen *in natura* (T1), refrigerado (T2) e descongelado (T3). As amostras foram avaliadas para: motilidade e vigor espermático, teste hiposmótico, integridade de membrana espermática, morfologia espermática e análise ultra-estrutural, além da mensuração do pH. Após a diluição com os diferentes meios, o sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,5mL, contendo  $40 \times 10^6$  espermatozóides móveis/palheta, e mantidas por 60 minutos à 5°C (T2); logo após, foram transferidos para o vapor de nitrogênio durante 20 minutos, e por fim, mergulhadas em nitrogênio. O armazenamento das palhetas foi em botijão criogênico. As palhetas foram descongeladas a 70°C por 8 segundos. A análise de variância mostrou influência do efeito animal nas variáveis analisadas, com exceção da motilidade espermática e integridade de membrana espermática. O teste hiposmótico, a integridade de membrana espermática e o pH, nas amostras refrigeradas (T2), apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os meios, com superioridade do MP50. Nas análises pós-descongelação (T3), não foram observadas diferenças significativas entre as variáveis estudadas para os dois meios. A análise ultra-estrutural, mostrou edema de membrana plasmática e acrossomal, nas diferentes etapas do processo de congelação. Em conclusão, considerando-se as características morfofuncionais do sêmen canino pós-descongelação, os meios diluidores demonstraram igualdade.

**Palavras chaves:** cão, sêmen, congelação e meio diluidor.

**ABSTRACT**

The objective of this study was to verify the efficiency of two different extenders for freezing dog semen: Tris/Glycerol and MP50. Ten ejaculates from different adult dogs were collected by digital manipulation. Seminal characteristics were evaluated in three different moments, fresh (T1), cooled (T2) and thawed (T3) semen for sperm motility and vigor, hypo-osmotic swelling test, sperm membrane integrity, sperm morphology, ultrastructural analysis and seminal pH. The samples were divided into two equal parts and each part was mixed with one extender type. After mixing, samples were packaged in 0,5mL French straws with  $40 \times 10^6$  spermatozoa/straw. Semen samples were kept at 5°C for 60 minutes (T2); then frozen in static vapor of nitrogen for the following 20 minutes and immersed in liquid nitrogen until being thawed in 70°C water for 8 seconds (T3). By analysis of variance, it would be possible to verify the animal effect on almost all variables observed in this study, except for sperm motility and membrane integrity. For cooled semen (T2), MP50 were significantly better for hypo-osmotic swelling test, sperm membrane integrity and pH ( $p < 0,05$ ) than Tris/Glycerol. For thawed semen (T3), there was no significant difference between extenders. By ultrastructural analysis, it was possible to verify swelling plasma and acrosomal sperm membranes in the different stages of freezing process. In conclusion, the extenders showed the same results as to morphofunctional characteristics the semen canine thawed.

**Keywords:** dog, semen, freezing and extender.

**Figura 2:** Fotomicrografias de espermatozóides caninos *in natura* - **T1** - (A1 e A2) e refrigerados em meio Tris/Glicerol – **T2M1** - (B1 e B2) e meio MP50 – **T2M2** - (C1 e C2).

A1) Corte longitudinal de espermatozóide com membrana plasmática (mp) edemaciada e ondulada (setas). Membrana acrossomal externa (me) íntegra. (8.400X).

A2) Corte oblíquo de espermatozóide com membrana plasmática (mp) ondulada e membrana acrossomal externa íntegra. (3.400X).

B1) e B2) Cortes oblíquos de espermatozóides com membranas plasmáticas (mp) edemaciadas e onduladas (setas). (4.600X e 11.500X, respectivamente).

C1) Corte transversal de espermatozóide com membrana plasmática (mp) edemaciada (setas) e membrana acrossomal externa íntegra. (3.400X).

C2) Espermatozóide com gota citoplasmática proximal (gcp), membrana plasmática (mp) edemaciada e membrana acrossomal externa ondulada. (3.400X).

**n** = núcleo; **mp** = membrana plasmática; **me** = membrana acrossomal externa;  
**ac** = acrossomo; **pa** = região pós-acrossomal; **f** = flagelo; **gcp** = gota citoplasmática proximal.

**Figura 3:** Fotomicrografias de espermatozóides caninos *in natura* - **T1** - (A1 e A2) e congelados em meio Tris/Glicerol – **T3M1** - (B1 e B2) e meio MP50 – **T3M2** - (C1 e C2).

A1) Corte longitudinal de espermatozóide com membrana plasmática (mp) edemaciada e ondulada (setas). Membrana acrossomal externa (me) íntegra. (8.400X).

A2) Corte oblíquo de espermatozóide com membrana plasmática (mp) ondulada e membrana acrossomal externa íntegra. (3.400X).

B1) e B2) Cortes longitudinais de espermatozóides com membranas plasmáticas (mp) edemaciadas e onduladas, e membranas acrossomais externas (me) com edema e ondulações. (8.400X e 4.600X, respectivamente).

C1) e C2) Cortes longitudinais de espermatozóides com membranas plasmáticas (mp) edemaciadas e onduladas, e membranas acrossomais externas (me) com edema e ondulações. (4.600X e 8.400X, respectivamente).

**n** = núcleo; **mp** = membrana plasmática; **me** = membrana acrossomal externa;  
**ac** = acrossomo; **pa** = região pós-acrossomal.