



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**USO DE GLICEROL, METIL-FORMAMIDA E DIMETIL-FORMAMIDA COMO
CRIOPROTETORES DO SÊMEN CANINO**

DANIELE OGA FUTINO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2008**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**USO DE GLICEROL, METIL-FORMAMIDA E DIMETIL-FORMAMIDA COMO
CRIOPROTETORES DO SÊMEN CANINO**

DANIELE OGA FUTINO

ORIENTADORA: CAROLINA MADEIRA LUCCI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 005/2008

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2008**

F996 Futino, Daniele Oga.
Uso de glicerol, metil-formamida e dimetil-formamida
como crioprotetores do sêmen canino / Daniele Oga Futino ;
Carolina Madeira Lucci, orientadora. – Brasília, 2008.
xv, 72 f. il. ; 30 cm.

Inclui bibliografia

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária, 2008.

1. Criopreservação. 2. Sêmen. 3. Amidas. 4. Cães. I.
Lucci, Carolina Madeira (orient.) II. Título

CDU 591.16

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**USO DE GLICEROL, METIL-FORMAMIDA E DIMETIL-FORMAMIDA COMO
CRIOPROTETORES DO SÊMEN CANINO**

DANIELE OGA FUTINO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Dra. (UnB)
(ORIENTADOR) CPF: 490390241-20 e-mail: cmlucci@unb.br**

**SÔNIA NAIR BÁO, Dra. (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 331 813 490-20 e-mail: snbao@unb.br**

**LÚCIA DANIEL MACHADO DA SILVA, Dra. (UECE) (EXAMINADOR EXTERNO)
CPF: 656 969 726-91 e-mail: lucia.daniel.machado@hotmail.com**

BRASÍLIA/DF, 30 de JUNHO de 2008

Aos meus pais com todo amor e carinho e aos meus cães Dolly (*in memorian*), Wolf (*in memorian*), Yumi e Miwa, fontes de inspiração e exemplos de companheirismo incondicional.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de demonstrar aqui a minha profunda gratidão a todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho e de forma especial, o meu muito obrigada:

Aos meus pais, Teruo e Marli, pelo amor e incentivo de toda uma vida e por terem me passado valores como respeito, dignidade, responsabilidade, humildade e sempre, muita coragem. Valores esses que me permitem hoje contribuir, de alguma forma, para o crescimento e formação daqueles que me cercam.

À minha irmã, Elaine, pelos conselhos e confortos sempre à disposição.

À minha orientadora Carol, a quem sou eternamente grata por todos esses anos de “cobaia”, amizade e dedicação. Agradeço não apenas pela brilhante orientação que me acompanhou desde a iniciação científica até a conclusão desta dissertação, mas também por ser um exemplo de perseverança, honestidade e personalidade. Muito do que hoje conquistei foi me espelhando nessa virginiana perfeccionista e idealizadora que sempre buscou concretizar seus ideais e sonhos. A você Carol, muito obrigada e o meu desejo de que continue a semear sempre o ideal da luta e da conquista.

À minha amiga e “anjinha da guarda” Marcela Cabral de Brito Mendes, sem cuja colaboração não teria sido possível a realização deste experimento, e pela disposição e simpatia nas horas mais difíceis.

Ao amigo Washington Neves Liberato de Matos pelo oferecimento das instalações e animais do Departamento de Polícia Federal e pela amizade e carinho, sempre levantando o meu astral com seu bom-humor e alegria contagiantes.

Ao Departamento de Polícia Federal que gentilmente cedeu seus cães e o espaço para a realização deste experimento e a toda a equipe de funcionários que auxiliaram na execução das coletas.

À professora Concepta McManus Pimentel pela orientação nas análises estatísticas.

Ao professor Rafael Gianella Mondadori pela ajuda nas interpretações dos dados do experimento.

Ao professor Ricardo Bentes de Azevedo, pelas observações sempre pertinentes.

À professora Margot Alves Nunes Dode pela disposição em nos ajudar neste trabalho.

Ao amigo José de Oliveira Carvalho Neto pela orientação e auxílio nas avaliações semanais.

Às minhas tias Mirtes Matiko Ouga e Marlene Miyako Ouga, presenças constantes em minha vida, pelo apoio e torcida para toda hora e pelas revisões ortográficas.

Ao Cássio Eduardo Costa, pelo amor e carinho e, principalmente, amizade e conforto, durante esses dez anos e pelas correções no inglês.

À Asha Rathie, pela amizade e apoio construídos e cultivados, ainda que à distância, e pelas correções no inglês.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

À FINATEC e à FAP-DF pelo apoio financeiro.

À UPIS pelo oferecimento das instalações e fornecimento de equipamentos.

Ao Laboratório de Morfologia e Morfogênese (IB - UnB) pela disponibilização do espaço físico.

Às amigas Paula Leite Antunes de Macedo, Bianca Regina Pereira Cardoso, Carla Dolores Barreto Gama da Silva, Roberta Normando Pinheiro e Ana Luisa Celular Junqueira pelos incontáveis momentos de alegrias e tristezas, na certeza de que sempre estarão ao meu lado nesta longa jornada.

Aos colegas de mestrado, doutorado e PIBIC, Emily Nóbrega Borges, Renata Carvalho Silva, Rogério Campos Barroso de Brito, Marcela Cabral de Brito Mendes, Juliana Caldas Pereira Plácido, Osmar Alves Carrijo-Junior, Carlos Magno Campos da Rocha Júnior, José Luiz Jivago de Paula Rôlo e Rodrigo Rêgo. Valoriza, ReproUnB!

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xv
CAPITULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA	3
1.2 OBJETIVOS	5
1.2.1 Objetivo Geral	5
1.2.2 Objetivos Específicos	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Inseminação Artificial e Preservação do Sêmen	6
2.2 Componentes dos meios diluidores	7
2.2.1 Tampões	7
2.2.2 Protetores de resfriamento	9
2.2.3 Açúcares	10
2.2.4 Crioprotetores	11
2.2.5 Aditivos	14
2.3 Meios diluidores	16
2.4 Processamento do sêmen	16
2.4.1 Congelação	16
2.4.2 Descongelação	18
2.5 Avaliação <i>in vitro</i> da criopreservação	19
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPITULO 2 – USO DE GLICEROL, METIL-FORMAMIDA E DIMETIL-FORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES DO SÊMEN CANINO	32
RESUMO	33
ABSTRACT	35
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 Animais	39
2.2 Meios diluidores	39
2.3 Coleta do sêmen	40
2.4 Processamento do sêmen	40
2.5 Descongelação	41
2.6 Avaliações seminais	41
2.7. Análise estatística	42
3. RESULTADOS	43
3.1 Sêmen fresco	43
3.2 Diluição, resfriamento e pós-descongelação	43
3.3 Teste de termorresistência	45

3.4 Integridade funcional da membrana plasmática	47
4. DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

USO DE GLICEROL, METIL-FORMAMIDA E DIMETIL-FORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES DO SÊMEN CANINO

Daniele Oga Futino, Carolina Madeira Lucci

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB/Brasília – DF

A crescente demanda por biotécnicas reprodutivas em cães tem despertado grande interesse no desenvolvimento de protocolos de congelação de sêmen canino que, associados à correta identificação do momento ótimo para a inseminação, resultem em taxas de fertilidade próximas às da inseminação artificial com sêmen fresco ou resfriado. A grande vantagem da congelação do sêmen é a sua viabilidade por tempo indeterminado. O crioprotetor de eleição na congelação do sêmen canino é o glicerol, entretanto a busca por crioprotetores alternativos tem sido crescente. O presente trabalho objetivou comparar a eficiência da metil-formamida (MF) e da dimetil-formamida (DF) em relação ao glicerol (GL) como crioprotetores na congelação do sêmen canino. Para o experimento, foram utilizadas *pools* de amostras de sêmen de cinco cães da Polícia Federal, coletadas por manipulação digital. Cada *pool* foi fracionado em três amostras, sendo cada uma delas submetida a um dos três crioprotetores, sempre à concentração final de 3% em diluidor Tris-gema. Cada tratamento foi repetido cinco vezes. O sêmen foi avaliado subjetivamente quanto à motilidade total e progressiva, vigor e morfologia logo após a coleta do sêmen, formação do *pool*, diluição, resfriamento e descongelação. As alíquotas foram resfriadas e equilibradas a 4°C por uma hora e meia e envasadas em palhetas de 0,5ml. Em seguida, procedeu-se a congelação, expondo-se as palhetas ao vapor de nitrogênio líquido por 15 minutos seguido de imersão e armazenamento no nitrogênio líquido. As palhetas foram acondicionadas em botijão criogênico por um período mínimo de sete dias antes da descongelação. A descongelação foi feita em banho-maria a 37°C durante um minuto, permanecendo a esta temperatura durante 30 minutos para a realização do teste hiposmótico (HOST). A longevidade espermática foi feita realizando-se o teste de termorresistência (TTR). A análise estatística foi realizada utilizando-se análises de variância (ANOVA) e teste PLSD de Fischer. As amostras de sêmen fresco apresentaram características físicas e morfológicas dentro da normalidade (93,60±7,60%, 90,40±8,70%, 4,8±0,44 e 90,25±3,17% para motilidade total, motilidade progressiva, vigor e morfologia normal, respectivamente). Após a descongelação, foram observadas diferenças significativas (P<0,05) entre GL e DF em relação à motilidade total e progressiva e vigor. Em relação à MF, não houve diferenças significativas em relação ao GL ou à DF em nenhum parâmetro avaliado. As médias para motilidade total, motilidade progressiva, vigor e morfologia normal na pós-descongelação foram 69,00±5,47%, 61,00±7,41%, 2,9±0,54% e 57,10±5,01% para o GL, 59,00±8,94%, 50,00±10,00%, 2,5±0,70 e 66,90±7,74% para a MF e 44,00±21,03%,

37,00±19,87%, 2,1±0,65 e 61,10±5,59% para a DF, respectivamente. No teste HOST, o GL apresentou-se superior à MF e DF (57,80±12,47%, 35,80±18,47% e 34,40±9,40%, porcentagens médias de células com membranas íntegras para GL, MF e DF, respectivamente). Durante o TRT, não houve diferenças entre o GL e a MF e ambos mostraram-se superior à DF. De acordo com os resultados encontrados, pode-se concluir que a MF apresenta resultados semelhantes ao GL, exceto no HOST, e, portanto pode ser considerada uma alternativa como crioprotetor na criopreservação de sêmen canino. Testes comparando diferentes concentrações da MF são necessários visando seu melhor desempenho como crioprotetor.

Palavras-chave: crioprotetores, amidas, congelação-descongelação, sêmen, cão.

ABSTRACT

USE OF GLYCEROL, METHYL-FORMAMIDE AND DIMETHYL-FORMAMIDE AS CRYOPROTECTANTS OF CANINE SEMEN

Due to an increasing demand for canine reproductive biotechnologies, it has been crescent interests for improving freezing protocols employed for canine semen which, associated to a correct identification of optimal breeding time, results on fertility rates close to those achieved with artificial insemination with fresh or cooled semen. The unlimited viability of cryopreserved semen is the greatest advantage of this technique. Glycerol is the most commonly used cryoprotectant for dog sperm however the search for alternative cryoprotectants has increased. The aim of the present work was to compare the efficiency of methyl-formamide (MF), dimethyl-formamide (DF) and glycerol (GL) as cryoprotectants in canine semen cryopreservation. Five dogs were used in the experiment. Ejaculates were collected, *pooled* and divided into three aliquots and each one was submitted to one of the three cryoprotectants, with final concentration of 3% in egg yolk-TRIS extender. Treatments were repeated five times. Semen was subjectively evaluated for total and progressive motility, vigor and morphology immediately after each of the following procedures: semen collection, *pool* formation, dilution, chilling and freezing/thawing. Sperm membrane functional integrity was assessed by hypo-osmotic swelling test (HOST), and longevity was assessed using the thermoresistance test (TRT). Fresh semen showed normal physical and morphological characteristics. After thawing, differences were observed between semen frozen using GL and DF regarding total and progressive motility and vigor ($P < 0.05$) but not between MF and GL or MF and DF. Means for total motility, progressive motility, vigor and morphologically normal spermatozoa were respectively $69.0 \pm 5.4\%$, $61.0 \pm 7.4\%$, 2.9 ± 0.5 and $57.1 \pm 5.0\%$ for GL, $59.0 \pm 8.9\%$, $50.0 \pm 10.0\%$, 2.5 ± 0.7 and $66.9 \pm 7.7\%$ for MF and $44.0 \pm 21.0\%$, $37.0 \pm 19.8\%$, 2.1 ± 0.6 and $61.1 \pm 5.5\%$ for DF. On HOST, GL was superior to MF and DF ($57.8 \pm 12.4\%$, $35.8 \pm 18.4\%$ and $34.4 \pm 9.4\%$, respectively). During TRT, both GL and MF were superior to DF, with no differences between GL and MF. In conclusion, the use of MF as cryoprotectant showed results similar to GL, except on HOST, and can be considered as an alternative in canine semen cryopreservation. Further studies testing different concentrations of MF may improve its effects on cryopreservation of canine semen.

Keywords: cryoprotectant agents, amides, freezing/thawing, sperm, dog.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
2. REVISÃO DE LITERATURA	
Figura 2.1. Estrutura química das amidas (metil-formamida e dimetil-formamida).	13
3. RESULTADOS	
Figura 3.1. Avaliação subjetiva durante o teste de termorresistência do sêmen canino pós-descongelamento no uso do GL, MF e DF. (A) Motilidade total; (B) Motilidade progressiva.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
3. RESULTADOS	
Tabela 3.1. Motilidade total (%) durante o processamento do sêmen usando Glicerol (GL), Metil-formamida (MF) e Dimetil-formamida (DF) como crioprotetores (média ± SD)	44
Tabela 3.2. Motilidade progressiva (%) durante o processamento do sêmen usando Glicerol (GL), Metil-formamida (MF) e Dimetil-formamida (DF) como crioprotetores (média ± SD)	44
Tabela 3.3. Vigor durante o processamento do sêmen usando Glicerol (GL), Metil-formamida (MF) e Dimetil-formamida (DF) como crioprotetores (média ± SD)	44
Tabela 3.4. Porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais durante o processamento do sêmen usando Glicerol (GL), Metil-formamida (MF) e Dimetil-formamida (DF) como crioprotetores (média ± SD)	45

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

DF – Dimetil-formamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

EG – Etileno glicol

FAP-DF - Fundação de Apoio à Pesquisa do DF

FINATEC - Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos

GL – Glicerol

GP – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

HOST – Teste hiposmótico

IA – Inseminação artificial

IAIU – Inseminação artificial intrauterina

IAIV – Inseminação artificial intravaginal

MF – Metil-formamida

SOD – Superóxido dismutase

TTR – Teste de termorresistência

UPIS-União Pioneira de Integração Social-Geral

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Tem sido crescente a demanda por biotécnicas reprodutivas em cães, tanto por parte de criadores de diversas raças, de proprietários de cães de estimação, bem como de animais de trabalho que possuem determinada característica desejável. Sendo assim, é de grande interesse preservar as características fenotípicas e genotípicas de determinado animal, otimizando e permitindo o intercâmbio e uso do material genético de animais de alto valor zootécnico ou sentimental. Além disso, devido à proximidade filogenética, o cão doméstico tem sido considerado não apenas como um animal de estimação, mas sim como um útil modelo experimental para outras espécies carnívoras (Goodrowe et al. 2000; Durrant et al. 2006).

Na prática, as biotécnicas mais utilizadas na reprodução assistida em cães domésticos têm se limitado principalmente à inseminação artificial (IA) e à preservação do sêmen, sendo esta feita de duas maneiras: através do resfriamento, que visa a utilização em curto prazo, e da congelação, que mantém o sêmen viável por tempo indeterminado.

Para a congelação de sêmen canino, o glicerol (GL) tem sido o crioprotetor mais utilizado. Contudo, os resultados apresentados na pós-descongelação são muito diversificados (Olar et al. 1989; Ström et al. 1997; Peña et al. 1998a; Rota et al. 1998; Silva et al. 2000; Okano et al. 2004) o que tem estimulado a busca por crioprotetores alternativos tais como o dimetilsulfóxido (DMSO) e o etileno glicol (EG), ambos empregados isoladamente ou em associação com o GL (Rohloff et al. 1978; Olar et al. 1989, Santos et al. 2001; Cavalcanti et al. 2002; Soares et al. 2002; Rota et al. 2006; Martins-Bessa et al. 2006). Entretanto, os resultados obtidos com o uso desses crioprotetores foram similares ou ainda piores que o GL. Uma outra alternativa para a congelação de sêmen são as amidas, que têm sido utilizadas com sucesso na criopreservação de sêmen de eqüinos (Gomes et al. 2002; Medeiros et al. 2002a; Squires et al. 2004; Alvarenga et al. 2005; Carmo et al. 2005), de aves

(Lukaszewicz 2002; Chalah et al. 1999; Tselutin et al. 1999), de peixes (McNiven et al. 1993; Ogier de Baulny et al. 1999), de suínos (Bianchi et al. 2008) e de coelhos (Hanada & Nagase 1980; Kashiwazaki et al. 2006; Okuda et al. 2007). Em cães, poucos estudos avaliaram os efeitos das amidas na criopreservação de sêmen (Oliveira 2003; Chirinéa et al. 2006; Zimmermann et al. 2007). Esses estudos avaliaram o uso da dimetil-formamida (DF) associada com outros crioprotetores e diferentes diluentes e, até o presente momento, não há trabalhos demonstrando especificamente o efeito das amidas na congelação do sêmen canino. Ademais, o uso da metil-formamida (MF) na criopreservação do sêmen canino nunca foi relatado. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da MF e da DF comparando com o GL na criopreservação do sêmen canino.

1.1 Problemática e Relevância

Nos últimos tempos, o cão tem deixado de ser meramente um simples animal de estimação para ocupar uma posição de destaque na vida do homem. A criação de cães de raça tornou-se altamente especializada, o que trouxe consigo todo o aparato técnico e mercadológico envolvido na busca pelo aprimoramento de uma raça. Além disso, devido às suas múltiplas habilidades, o cão tem sido cada vez mais requisitado para o desempenho de atividades de utilidade pública, tais como guias de deficientes visuais, busca de entorpecentes e explosivos, busca de vítimas de soterramento e auxiliares de tratamentos em hospitais e de deficientes mentais. Na linha preservacionista, pesquisas com o cão doméstico abrem perspectivas para a conservação e preservação de espécies canídeas ameaçadas ou em risco de extinção.

É nesse contexto de maior importância do cão na vida do homem que se reflete uma maior demanda por biotécnicas reprodutivas que visem à propagação e ao armazenamento do material genético de animais de elevado valor zootécnico, sentimental e comportamental. Dentre essas biotécnicas, um grande avanço pode ser observado na criopreservação do sêmen canino.

Com base na revisão de literatura apresentada a seguir, pode-se observar que diversos estudos têm sido feitos no intuito de se obter protocolos efetivos e viáveis para a congelação do sêmen de cães. Hoje em dia, as combinações entre os diluidores e agentes crioprotetores, bem como as metodologias utilizadas, são bastante variadas, não havendo um

protocolo padrão ou mesmo uma metodologia mais eficaz na congelação do sêmen canino. Assim, cada laboratório ou empresa emprega o protocolo de maior conveniência, fato este que justifica a grande variabilidade encontrada na fertilidade do sêmen canino criopreservado.

Para o sêmen canino, o GL é o crioprotetor mais utilizado, contudo os resultados obtidos com a viabilidade espermática na pós-descongelação têm sido bastante variáveis. Visando obter melhores índices com a IA com sêmen congelado, outras substâncias têm sido testadas como crioprotetores, tais como o DMSO e o EG. Entretanto esses crioprotetores alternativos mostraram resultados semelhantes ou mesmo piores que o GL. Uma categoria de crioprotetores que tem sido empregada com sucesso em outras espécies são as amidas. Na criopreservação de sêmen de coelhos, as amidas, e não o GL, são os crioprotetores de eleição. Em aves e peixes, o uso das amidas na congelação de sêmen dessas espécies têm resultado em boas taxas de fertilidade, bem como em garanhões, cujas taxas de motilidade e fertilidade na pós-descongelação são baixas, quando o GL é empregado como crioprotetor.

Até o presente momento, poucas publicações foram feitas relatando o uso das amidas no sêmen de cães. O resultado apresentado por esses trabalhos indicam a possibilidade da utilização da DF como crioprotetor na criopreservação do sêmen de cães (Oliveira 2003; Zimmermann et al. 2007). Em relação à MF não há relatos na literatura concernentes ao seu uso no sêmen canino. Dessa forma, a justificativa do presente trabalho se baseia na necessidade de comparar os efeitos da MF, DF e GL na criopreservação do sêmen canino.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

- Comparar a eficiência da metil-formamida e da dimetil-formamida com a do glicerol na criopreservação do sêmen canino.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos dos crioprotetores na motilidade total e progressiva, vigor e morfologia no sêmen durante as diferentes etapas do processamento de criopreservação;

- Comparar a longevidade proporcionada pelos crioprotetores na pós-descongelção por meio do teste de termorresistência;

- Verificar o efeito dos crioprotetores sobre a integridade funcional da membrana plasmática na pós-descongelção através do teste hiposmótico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inseminação Artificial e Preservação do Sêmen

A inseminação artificial (IA) tem sido largamente requisitada por proprietários ou criadores de cães de raça. São várias as situações em que a IA é recomendada, tais como a inabilidade ou dificuldade do macho ou da fêmea em realizar a cópula, defeitos de conformação vaginal adquiridos ou congênitos, diferença de tamanho entre macho e fêmea, controle de transmissão de doenças venéreas, não aceitação ou desinteresse ou ainda distância entre o macho e a fêmea (Feldman & Nelson 2004). Os métodos de IA descritos para cães têm sido a IA intravaginal (IAIV) e a intrauterina (IAIU). Na IAIV, o sêmen é depositado na porção cranial da vagina com o auxílio de uma pipeta de inseminação ou sonda. Já na IAIU, a deposição do sêmen é feita diretamente no corpo do útero via transcervical ou por meio de procedimentos cirúrgicos transabdominais como a laparotomia ou a laparoscopia (Farstad 2000; Blendinger 2007). A IA pode ser feita utilizando-se sêmen fresco, resfriado ou congelado-descongelado.

O resfriamento do sêmen tem como principal finalidade prolongar sua viabilidade ao longo do tempo. Esta biotécnica torna-se bastante útil quando o macho e a fêmea encontram-se geograficamente distantes um do outro ou, ainda, quando os animais têm alguma exposição ou trabalho agendados, ocasiões em que os deslocamentos são constantes impossibilitando a cobertura da fêmea. A IA com sêmen resfriado tem se tornado particularmente atrativa em cães devido a fatores como maior durabilidade do sêmen canino em comparação às outras espécies, relativa simplicidade no processo de resfriamento associadas à crescente demanda por sêmen entre criadores em um mesmo país (Johnston et al. 2001; Peña et al. 2006).

O sêmen criopreservado, além dos benefícios proporcionados pelo sêmen resfriado, apresenta as vantagens de permitir o armazenamento do material genético por tempo indeterminado, transporte internacional do sêmen, utilização do sêmen no período fértil ótimo da cadela, preservação do sêmen de um cão mesmo após a sua morte e formação de bancos de germoplasma (Johnston et al. 2001).

2.2 Componentes dos meios diluidores

Para que o sêmen possa ser refrigerado ou criopreservado, ele deve ser devidamente diluído. O diluidor tem como função proteger o espermatozóide contra o choque térmico conservando sua motilidade e fertilidade. Além disso, o diluidor deve promover a estabilização da membrana plasmática fornecendo substratos energéticos, prevenir os efeitos deletérios das alterações de pH e osmolaridade (Verstegen et al. 2005), evitar o crescimento de bactérias e proteger as células espermáticas dos danos causados durante o resfriamento, a congelação e a descongelação quando for o caso. Dessa forma, nos diluentes para a congelação de sêmen faz-se necessária a adição de substâncias denominadas crioprotetores, cuja presença é essencial para a manutenção da qualidade espermática após os processos de congelação e descongelação (Johnston et al. 2001). Assim, para um diluidor atender às suas funções na criopreservação de sêmen, ele deve conter um sistema tampão, protetores de resfriamento, substrato energético, crioprotetores e, opcionalmente, aditivos e antibióticos.

2.2.1 Tampões

A atividade metabólica dos espermatozoides resulta em um aumento da concentração de íons hidrogênio. Se não houver um mecanismo de remoção desses íons, o pH do diluidor é reduzido e a longevidade e fertilidade espermática são diminuídas (England 1993). Dessa forma, os sistemas tampões são utilizados para manter o equilíbrio iônico e o pH do diluidor. O pH ótimo de um diluidor de sêmen deve ser de 6,75 a 7,50 e a osmolaridade de 300 a 325 mOsm (Johnston et al. 2001).

Substâncias como o Tris (tris-hidroximetilaminometano), o Tes (N-Tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfônico), Test (Tes titulado com Tris), Hepes (ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1), Bes (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico) e Pipes (piperazina-1,4-bis(2-ácido etanosulfônico) têm sido comumente utilizados como sistemas tampões nos diluentes seminais de diferentes espécies. (Salamon & Maxwell 1995).

Os primeiros estudos com congelação do sêmen canino utilizaram o tampão Krebs-Ringer-fosfato, entretanto essa solução não é atóxica para os espermatozóides (England 1993). Posteriormente, Foote (1964) utilizou o Tris como tampão associado ao citrato de sódio no diluidor do sêmen canino e a partir de então, o Tris tornou-se o diluente mais utilizado para a congelação do sêmen canino. Adaptações desse método também foram largamente empregadas, principalmente a inclusão da gema de ovo que também apresenta uma capacidade tamponante (England 1993). Smith (1984) e Smith & Graham (1984) obtiveram melhores taxas de motilidade na pós-descongelação com o uso do tampão Pipes quando comparado com Bes, Tes ou Tris (apud England 1993). Entretanto estudos subseqüentes utilizando este método resultaram em baixas taxas de gestação (England 1993). Combinações de Tris e Tes também foram testadas, entretanto o Tris, quando usado isoladamente, mostrou-se melhor para alguns cães (Farstad 1996). Bueno et al. (2001) realizando testes *in vitro* em amostras de sêmen de cães concluiu que o meio diluidor Tris-citrato-gema de ovo é mais eficiente em preservar a qualidade das células espermáticas do que o meio Tes-Tris.

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico - $C_6H_8O_7$) é um ácido fraco inorgânico, facilmente encontrado nos frutos cítricos, que também entra na composição do diluente Tris (Silva 2005). De acordo com Silva & Verstegen (1995), é provável que o ácido cítrico contribua para a preservação da célula espermática auxiliando na manutenção do pH do diluente e atuando como antioxidante, bem como no mecanismo de respiração celular.

De um modo geral, substâncias de poder tamponante incluindo citrato de sódio, Tris ou Tes, têm sido utilizados com sucesso na preservação de gametas de canídeos (Silva & Verstegen 1995; Farstad 1996; Cardoso et al. 2000; Rota et al. 2006).

2.2.2 Protetores de resfriamento

A adição de protetores de resfriamento nos diluidores é necessária para conferir proteção aos espermatozóides contra o choque térmico durante a congelação e a descongelação. A gema de ovo é amplamente utilizada na composição de diluidores à base de Tris e leite desnatado. Sua adição ao diluente previne a capacitação espermática e a reação acrossomal durante o armazenamento a 4°C (Witte et al. 2008). Além disso, acredita-se que a presença da lecitina fosfatidilcolina na gema de ovo confira proteção à membrana espermática ao restaurar os fosfolípídeos perdidos durante o choque térmico (Farstad 1996).

Na maioria dos trabalhos com sêmen congelado de cão, a gema de ovo de galinha tem sido empregada como o principal protetor de resfriamento (Olar et al. 1989; Peña et al. 1998a; Okano et al. 2004; Alhaider & Watson, 2008) e sua concentração nos diluentes para a congelação do sêmen canino têm variado entre 10 a 20% v/v. England (1992, apud Farstad 1996) reportou uma melhor qualidade pós-descongelação com 10% de gema de ovo v/v do que 20%. Em contraste, Silva et al. (2000) observaram uma superioridade da adição de gema de ovo a 20% em relação a 10% em meio Tris. Já Davies (1982, apud England 1993) apesar de não ter encontrado diferença estatisticamente significativa entre 10 e 20%, em termos absolutos, obteve uma maior motilidade pós-descongelação com 20%. Ademais, considerando que a gema de ovo também tem uma capacidade de tampão, a quantidade desta no meio pode variar de acordo com a capacidade tamponante dos outros componentes do diluente (Farstad 1996).

Apesar dos efeitos benéficos da gema de ovo, não se sabe se há outros componentes além da lecitina que sejam adequados ao sêmen canino, tornando o seu uso de forma integral amplamente questionável (Farstad 1996). Além disso, por possuir origem biológica, a gema de ovo incorre no risco da transmissão de doenças como a influenza aviária (Abe et al. 2008). No entanto, o exato modo de ação da gema de ovo ainda é incerto e por essa razão poucos progressos têm sido alcançados no intuito de encontrar substitutos à gema de ovo (Holt 2000).

Dentre às possíveis alternativas encontram-se os análogos do hidroxitolueno butilado (BHT) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) purificadas da gema de ovo (Moussa et al. 2002). A literatura referente à congelação de sêmen canino utilizando diluidores sem gema de ovo ainda é escassa. Dentre os trabalhos que não usaram gema de ovo, Silva et al. (2002) obtiveram uma motilidade espermática no pós-descongelação de 35%

em meio Tris-glicerol e Abe et al. (2008) de 25 a 89% em meio leite desnatado-glicose-glicerol.

2.2.3 Açúcares

Os açúcares também são adicionados ao meio diluidor e têm como função fornecer o substrato energético para as células espermáticas, além de manterem a pressão osmótica do diluente e de possuírem ação crioprotetora (Yildiz et al. 2000). A literatura tem relatado os efeitos benéficos de açúcares como a frutose, glicose, sucrose, lactose, rafinose, trealose e metil-celulose na motilidade do sêmen congelado-descongelado de diversas espécies (De Leeuw 1993; Holt 2000; Yildiz et al. 2000; Aisen et al. 2002).

Apesar de o plasma seminal canino não possuir grandes quantidades dos açúcares mais comuns, suas células espermáticas são capazes de utilizar os açúcares como fonte de energia eficientemente (Rigau et al. 2001). Os espermatozóides caninos podem obter sua energia para manutenção da motilidade através de diferentes processos glicolíticos e do ciclo de Krebs (Rigau et al. 2001). Além disso, as diferenças nos mecanismos de ação dos açúcares determinam o tipo ou localização do efeito protetor conferido ao espermatozóide (Yildiz et al. 2000). No estudo de Yildiz et al. (2000), os dissacarídeos trealose, maltose e sucrose reduziram as taxas de espermatozóides mortos e de acrossomas lesados, enquanto que os monossacarídeos galactose, glicose e, especialmente, a frutose e a xilose, melhoraram a motilidade, viabilidade e a porcentagem de acrossomas intactos após a descongelação. Já o trissacarídeo rafinose não melhorou os parâmetros espermáticos quando comparado ao diluente sem adição de açúcar. Corroborando com essas informações, Rigau et al. (2001) observaram que ao incubar o sêmen fresco em soluções de frutose e glicose, o padrão de motilidade conferido por esses açúcares foi diferente, sendo que a frutose promoveu uma motilidade mais rápida e linear que a glicose (Rigau et al. 2001).

Atualmente, a maioria dos diluidores utilizados na criopreservação do sêmen canino contém glicose (Peña & Linde-Forsberg, 2000; Rota et al. 1998) ou frutose (Silva et al. 2006; Martins-Bessa et al. 2006). Já o uso da lactose tem sido mais controverso com relatos de resultados satisfatórios (Ivanova et al. 1999; Oliveira et al. 1999) e insatisfatórios (Olar et al. 1989; Weiss et al. 2000).

2.2.4 Crioprotetores

A utilização de agentes crioprotetores é indispensável na criopreservação do sêmen por atuar reduzindo a quantidade de cristais de gelo formada em temperaturas abaixo de zero, permitindo a manutenção da viabilidade espermática na pós-descongelção (Polge et al. 1949; Polge & Rowson 1952). Os agentes crioprotetores podem ser divididos em dois grupos: os que atuam no meio extracelular (açúcares, proteínas, polivinil-pirrolidona) e os que penetram na célula (glicerol, metanol, etileno glicol, dimetilsulfóxido e as amidas) (England 1993).

Os crioprotetores não penetrantes protegem a célula por meio de efeitos osmóticos. Estas substâncias criam um meio hipertônico que induz à saída de água do meio intracelular para o extracelular, causando a desidratação do espermatozóide reduzindo assim, a probabilidade de formação de cristais de gelo dentro da célula espermática durante a congelação (Aisen et al. 2002).

Yildiz et al. (2000), testando o efeito da adição de açúcares ao diluidor sobre a viabilidade dos espermatozoides caninos pós-descongelção, observaram que monossacarídeos, especialmente a frutose e a xilose, melhoraram as taxas de motilidade, viabilidade e de acrossomas intactos, concluindo que o efeito e o local de proteção sobre os espermatozoides variam de acordo com o tipo de açúcar.

Já os crioprotetores penetrantes atuam por meio de suas propriedades coligativas e ligantes com a água e diminuem o ponto crioscópico intracelular. Com isso, a quantidade de água que permanece no estado líquido sob baixas temperaturas é maior, diminuindo a concentração intracelular de solutos e eletrólitos na fração não congelada. Essas características dos crioprotetores penetrantes reduzem os danos oriundos do processo de congelação-descongelção, denominado “efeito solução” (Holt 2000).

Dentre esses crioprotetores, o GL tem sido o mais utilizado na congelação de sêmen canino. Entretanto, os resultados de motilidade pós-descongelção obtidos por alguns autores têm variado desde 22% a 75% (Olar et al. 1989; Peña et al 1998a; Silva et al. 2000; Okano et al. 2004; Ström et al. 1997). Este fato se deve à capacidade do espermatozóide canino resistir a uma ampla faixa de diferentes concentrações de GL (1% a 16%) (Olar et al. 1989; Peña et al 1998a; Rota et al. 1998). Apesar de suas propriedades crioprotetoras, o GL apresenta efeitos deletérios na organização e viscosidade do citoplasma e na permeabilidade e

estabilidade da membrana plasmática (Hammerstedt & Graham 1992; McLaughlin et al. 1992; Holt 2000), surgindo assim a necessidade de se testar alternativas a esse crioprotetor.

Resultados de trabalhos prévios em congelação de sêmen canino comparando o GL com outros crioprotetores ainda são poucos e bastante contraditórios. Rohloff et al. (1978) demonstraram a superioridade da capacidade crioprotetora do GL em comparação ao DMSO sendo que os melhores resultados foram obtidos através da combinação GL e DMSO a concentrações máximas de 8 e 1%, respectivamente. Em contraste, Olar et al. (1989) observaram que a adição do DMSO, sozinho ou em combinação com o GL, não foi benéfica à sobrevivência dos espermatozóides na pós-descongelação, chegando a reduzir a motilidade a valores inferiores àqueles observados quando nenhum crioprotetor foi empregado. Na literatura, o único trabalho utilizando o metanol como crioprotetor na congelação de sêmen canino reportou uma taxa de concepção de 42,8% (Kim et al. 1994). Já um estudo feito por Rota et al. (2006) mostrou que o EG foi superior ao GL na qualidade pós-descongelação do sêmen canino. Estes resultados contrastam com os encontrados por Soares et al. (2002) que afirmaram não haver diferenças na motilidade pós-descongelação entre o GL e o EG em três diferentes concentrações e também aos descritos por Martins-Bessa et al. (2006) e Cavalcanti et al. (2002) que não observaram vantagens na utilização do EG em substituição ao GL.

Outra opção de crioprotetor na congelação de sêmen são as amidas, compostos orgânicos derivados dos ácidos carboxílicos e aminas, resultante da substituição do grupamento OH por um grupo NH_2 , NHR ou NR. A estrutura química das amidas (metil-formamida e dimetil-formamida) é apresentada na Figura 2.1.

Por possuírem um baixo peso molecular e uma grande solubilidade em água, as amidas penetram mais rapidamente que o GL nas membranas das células espermáticas. Essas características, aliadas à baixa toxicidade das amidas, são altamente desejáveis a um crioprotetor, uma vez que induzem a menores danos osmóticos aos espermatozóides (Oliveira 2003; Alvarenga et al. 2005).

Para alguns animais tais como coelhos, galos e peixes, as amidas têm sido freqüentemente utilizadas como crioprotetores em substituição ao GL (Hanada & Nagase 1980; Chalah et al. 1999; ; Ogier de Baulny et al. 1999; Tselutin et al. 1999; Lukaszewicz 2002; Kashiwazaki et al. 2006). Além disso, as amidas têm sido bastante utilizadas como alternativa na criopreservação de sêmen equino. Alvarenga et al. (2005), em uma série de estudos comparando diferentes crioprotetores, observaram que a utilização da MF e da DF nos diluentes para a congelação de sêmen equino resultou em uma maior motilidade e preservação da integridade de membrana na pós-descongelação do que o GL. Além disso,

garanhões que apresentavam baixa taxa de motilidade e fertilidade na pós-descongelção com diluentes contendo GL, obtiveram uma melhora significativa com o uso das amidas (Medeiros et al. 2002a; Squires et al. 2004; Alvarenga et al. 2005). Em caprinos, o estudo feito por Silva (2004) mostrou que a DF, quando utilizada de forma isolada ou associada ao GL, manteve a qualidade espermática caprina após a criopreservação podendo ser empregada como um crioprotetor alternativo ao GL. Já em ovinos, Fidelis et al. (2006) observaram que a DF poderia ser utilizada como crioprotetor em concentrações ao redor de 5%. Mais recentemente, as amidas também mostraram ser eficazes na criopreservação de sêmen suíno, especialmente a dimetil-acetamida a 5% (Bianchi et al. 2008).

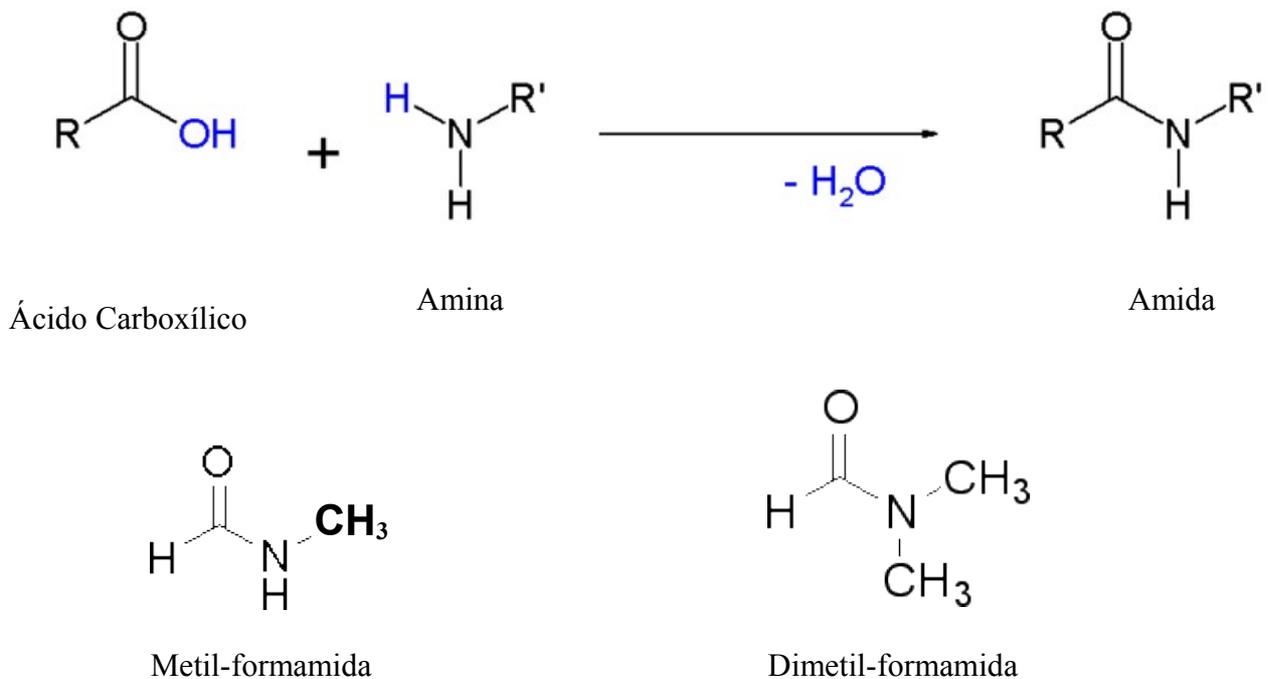


Figura 2.1. Estrutura química das amidas (metil-formamida e dimetil-formamida).

Fonte: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Amide>>

Em cães, poucos trabalhos avaliaram o efeito das amidas na criopreservação do sêmen. Oliveira (2003) estudando a eficácia de diferentes meios diluidores não encontrou diferenças entre o meio lactose gema contendo 5% de EG ou 5% de DF nas taxas de

motilidade progressiva e longevidade pós-descongelamento, entretanto, a DF foi menos eficaz em preservar a integridade funcional da membrana plasmática que o EG. Zimmermann et al. (2007) testando diferentes diluidores com GL ou DF concluíram que o diluidor Tris-gema com 7% de DF pode ser utilizado como alternativa na criopreservação do sêmen canino. Chirinéa et al. (2006) comparando dois diluentes, um contendo 8% de GL e o outro uma associação de 3% de GL com 2% de DF, mostraram não haver diferenças entre os meios na pós-descongelamento, entretanto os autores relataram um melhor desempenho da associação durante a etapa de resfriamento.

2.2.5 Aditivos

Visando melhorar a qualidade e longevidade do sêmen canino congelado-descongelado, componentes aditivos como detergentes, antioxidantes e aminoácidos têm sido testados e adicionados ao meio diluente.

A adição de compostos detergentes, como o Equex STM paste ou o Orvus ES paste em diluentes de congelamento parece ser benéfica para várias espécies, incluindo a espécie canina (Rota et al. 1997; Peña & Linde-Forsberg 2000; Alhaider & Watson 2008). Essas pastas são aditivos comerciais que contêm o dodecil sulfato de sódio (SDS), cuja natureza da proteção conferida não é completamente elucidada, mas sugere-se que o efeito seja exercido diretamente no meio extracelular, solubilizando as lipoproteínas da gema do ovo e aumentando, desta forma, seu potencial de proteção (Holt 2000; Peña & Linde-Forsberg 2000). Como consequência, estes aditivos possibilitam um aumento na resistência aos danos oriundos da congelamento, melhorando o tempo de sobrevivência espermática, prolongando a manutenção da motilidade e integridade da membrana plasmática e preservando a integridade acrossomal após a descongelamento (Rota et al. 1997; Peña et al. 1998b; Hori et al. 2006; Ponglowhapan & Chatdarong 2008).

Outro aditivo que tem sido amplamente explorado são os antioxidantes. Os antioxidantes são substâncias que protegem as células dos efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio são moléculas formadas a partir da redução incompleta do oxigênio e sua produção tem sido associada à queda da motilidade espermática, diminuição da capacidade de ligação oócito-espermatozóide e infertilidade (Medeiros et al. 2002b; Michael et al. 2007). Propõe-se que a suplementação com agentes antioxidantes

reduza o estresse do impacto oxidativo e com isso, melhore a qualidade do sêmen após a descongelação (Michael et al. 2007).

Esses sistemas antioxidantes podem atuar em duas direções: como removedor do agente oxidante antes que ele ocasione lesão celular (glutathione reduzida – GSH; superóxido dismutase – SOD; catalase; glutathione peroxidase – GP e a vitamina E), ou ainda como agente reparador da lesão já ocorrida (ácido ascórbico; glutathione reductase – GR e glutathione peroxidase – GPx) (Valença & Guerra 2007). Cassani et al. (2005) relataram a presença de sistemas tipo SOD no plasma seminal canino e sugeriram um efeito protetor desse sistema enzimático sobre o estresse oxidativo no espermatozóide canino. Vários agentes antioxidantes, tais como a vitamina E e C, catalase, DMSO, taurina, hipotaurina e N-acetilcisteína, já foram testados em sêmen de diversas espécies, inclusive cães, apresentando eficácia e utilidade controversa. Em cães, a suplementação oral com vitamina E protegeu o sêmen fresco do estresse oxidativo (Hatamoto et al. 2006), e no sêmen congelado-descongelado, a adição de catalase, N-acetilcisteína, taurina ou vitamina E no diluidor tiveram um efeito positivo na motilidade, viabilidade e HOST+ (Michael et al. 2007). Peña et al. (1998c) observaram uma melhor motilidade, longevidade e integridade acrossomal do sêmen após a descongelação com a inclusão da prolina. Já a incorporação da taurina e hipotaurina no diluidor Uppsala Equex II não trouxeram os mesmos benefícios (Martins-Bessa et al. 2007).

Além dos danos físicos como a formação intracelular de cristais de gelo e da desidratação, a apoptose também constitui um fator de redução da viabilidade espermática induzida pelo processo de criopreservação. A apoptose, ou morte celular programada, é um evento gene-ativado que ocorre como uma consequência normal do desenvolvimento e como resultado do estresse celular. Sua ativação é mediada pela família das proteases cisteína-dependente (cysteine-dependent aspartate-specific proteases - caspases). Em vista disso, o uso de agentes inibidores das caspases tem sido utilizado na preservação de diferentes tipos celulares de mamíferos (Baust et al. 2000; Yagi et al. 2001; Sosef et al. 2005). Em cães, estudos preliminares da adição de agentes anti-caspases no diluidor seminal demonstraram não trazer benefícios à motilidade espermática do sêmen congelado-descongelado (Peter & Linde-Forsberg 2003). Entretanto, apesar dos baixos resultados obtidos com o inibidor de caspases zVAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone), esses mesmos autores acreditam que outros tipos de inibidores de caspases podem ser mais adequados na criopreservação do sêmen canino.

2.3 Meios diluidores

O meio diluidor deve proteger as células espermáticas dos efeitos adversos de todo o processo de criopreservação. A capacidade protetora de um meio diluidor é atribuída às diferentes substâncias que irão compor este meio e da sua interação com as células espermáticas. Dessa maneira, a combinação entre essas diferentes substâncias deram origem aos diversos tipos de diluidores.

Os primeiros experimentos para preservação do sêmen canino utilizaram adaptações empíricas de diluidores empregados no resfriamento e congelação de sêmen bovino. Tais diluidores eram compostos por tampões à base de leite desnatado, fosfato-glicose, citrato, cloreto de fosfato, lactose, Tris e Tris-frutose-citrato (Farstad 1996). Atualmente, os diluidores preparados em laboratórios mais empregados na criopreservação de sêmen canino contêm o Tris como agente tamponante, glicose ou frutose como fontes de energia, gema de ovo como protetor de resfriamento e o glicerol como agente crioprotetor (Verstegen et al. 2005; Peña et al. 2006; Alhaider & Watson 2008). Outra opção de diluidores são os produzidos comercialmente (Biociphos W482 e Laiciphos 478 - IMV, França; CLONE - Cryogenic Laboratories of New England, Inc; Triladyl - Minitub, Tiefenbach, Alemanha) e mais recentemente, o ACP®, feito à base de água de coco. Apesar da composição exata de alguns deles não ser divulgada pelas empresas (Farstad, 1996), os resultados encontrados por diferentes grupos de pesquisadores (Dobrinski et al. 1993; Silva & Verstegen 1995; Nöthling et al. 1995; Ström et al. 1997; Cardoso et al. 2005b) mostraram que todos foram adequados para a congelação do sêmen canino.

2.4 Processamento do sêmen

2.4.1 Congelação

Diversas metodologias têm sido testadas para a congelação do sêmen de cães apresentando resultados diferenciados. Essa variação se deve aos diluentes, protetores de resfriamento e agentes crioprotetores empregados, associados ao uso de diferentes taxas de

congelamento (Rota et al. 1998). Adaptações do método de criopreservação de sêmen canino descrito por Andersen têm sido o protocolo mais usual (Olar et al. 1989). Neste método, a diluição do sêmen é realizada a 37°C em Tris acrescido de gema de ovo e glicerol. Em seguida, é procedido um período de equilíbrio de três horas, seguido do envase em palhetas plásticas e a exposição aos vapores de nitrogênio para congelamento. As adaptações relacionam-se principalmente ao momento de adição do crioprotetor (Rota et al. 1998; Okano et al. 2004; Martins-Bessa et al. 2006; Abe et al. 2008), tempo de equilíbrio (Rota et al. 1998; Okano et al. 2004; Martins-Bessa et al. 2006; Alhaider & Watson 2008) e proporção sêmen:diluidor (Rota et al. 1998; Okano et al. 2004; Cardoso et al. 2006).

Okano et al. (2004) avaliando os efeitos das diferentes formas de processamento do sêmen observaram que a diluição variando de 2,5:1 a 10:1 não afetou a motilidade após descongelamento e que se o sêmen for devidamente resfriado antes da adição do GL, o tempo de equilíbrio não precisa ser longo.

O método CLONE foi desenvolvido para aplicação comercial pelo Cryogenic Laboratories of New England, Inc. (CLONE) e tem sido utilizado desde 1983. Ele consiste na diluição do sêmen à temperatura ambiente em um diluente denominado Clone A, procedido um período de equilíbrio de uma hora, adição do diluente Clone B, envase e exposição aos vapores de nitrogênio. O método CLONE, assim como o método de Andersen, tem sido utilizado com sucesso na criopreservação do sêmen canino (Ström 1997).

Vários autores observaram que taxas de congelamento moderada (-5°C/min de 5 a -15°C e -10°C a -50°C/min de -15°C a -100°C) preservam melhor a motilidade após a descongelamento que taxas lentas ou rápidas (Olar et al. 1989; Rota et al. 1998; Ström et al. 1997; Peña & Linde-Forsberg 2000). Em contraste, Dobrinski et al. (1993) e Smith (1984, apud England 1993) afirmaram que taxas de congelamento lenta são melhores. Já Smith & Graham (1984, apud Ström et al. 1997) reportaram que taxas de congelamento super lenta (1,89°C/min de 5°C à -100C) resultaram em melhores motilidades pós-descongelamento. Rota et al. (1998) comparando duas taxas de congelamento; lenta (10°C/min de -6°C à -40°C) e rápida (50°C/min de -6°C à -40°C); observaram maior motilidade espermática imediatamente após a descongelamento quando o sêmen foi submetido à taxa de congelamento rápida, mas que, em relação à longevidade pós-descongelamento, a taxa de congelamento não teve influência.

Outra metodologia que tem sido empregada com sucesso são os equipamentos para redução gradativa da temperatura, tais como os tanques de congelamento (Peña & Linde-Forsberg 2000), ultra-freezers (Álamo et al. 2005; Batista et al. 2006) e máquinas computadorizadas de congelamento (Rota et al. 2005; Schäfer-Somi et al. 2006). Esses

equipamentos têm mostrado melhores resultados que os métodos convencionais que utilizam a exposição direta aos vapores de nitrogênio, pois impedem a ocorrência de oscilações térmicas durante a congelação, possibilitando uma melhora nos resultados após a descongelação (Silva 2007).

2.4.2 Descongelação

O processo de descongelação parece ser tão deletério aos espermatozoides quanto à congelação e os principais efeitos adversos são atribuídos à recristalização de microcristais de gelo intracelular, quando a descongelação é realizada lentamente, ou devido a alterações bruscas do volume celular, quando a descongelação se procede muito rapidamente, além de alterações de estrutura e função da membrana plasmática (Watson 1995; Holt 2000). Farstad (1996) afirma que uma congelação rápida exige uma forma de descongelação igualmente rápida, visando à manutenção da osmolaridade, pH e equilíbrio iônico das amostras de sêmen, possibilitando a reidratação e prevenindo o dano celular originário do crioprocessamento.

Assim como na congelação, existem diversos protocolos de descongelação para o sêmen preconizando diferentes temperaturas e velocidades. Na literatura, este processo geralmente é realizado imergindo-se as palhetas de sêmen em banho-maria a temperaturas que variam de 1°C (Olar et al. 1989), passando por 30°C a 37°C (Olar et al. 1989; Ström et al. 1997; Hori et al. 2006) até 70°C a 75°C (Olar et al. 1989; Ström et al. 1997; Schäfer-Somi et al. 2006).

Olar et al. (1989), comparando três temperaturas de descongelação (1°C por 120s, 35°C por 30s e 75°C por 12s), observaram que a descongelação rápida (75°C) foi superior à descongelação lenta (1° e 35°C), mas que entre estas últimas não houve diferença significativa. Resultados similares foram encontrados por Peña & Linde-Forsberg (2000), Ström et al. (1997) e Rota et al. (1998) que relataram a superioridade da descongelação a 70°C sobre a de 37°C. Contrariamente, Silva et al. (1998) concluíram que a temperatura de 37°C por 60s preserva mais eficazmente a qualidade do sêmen canino que a 50°C por 8s. Por outro lado, Ivanova-Kicheva et al. (1995) observaram uma maior efetividade da temperatura de 55°C por 5s para a viabilidade espermática do que a temperatura de 37°C por 8s.

De um modo geral, a escolha da taxa de descongelamento deve relacionar-se com a taxa de congelamento para a sobrevivência ótima das células espermáticas (Hammerstedt et al. 1990), ou seja, se a congelamento foi realizada de maneira rápida, assim deve ser procedida a descongelamento, e se a congelamento foi realizada de forma lenta, também deve ser lenta a descongelamento (Ström et al. 1997). Atualmente, as temperaturas mais empregadas para a descongelamento do sêmen canino envasado em palhetas têm sido as de 37° e 75°C.

2.5 Avaliação *in vitro* da criopreservação

Apesar das inúmeras pesquisas acerca das biotécnicas de preservação de gametas, os protocolos de criopreservação de sêmen atualmente utilizados, invariavelmente induzem a danos osmóticos, químicos e mecânicos às células espermáticas (Hammerstedt et al. 1990). Esses danos são responsáveis não apenas pela morte dos espermatozoides, mas também por uma série de alterações nas células espermáticas remanescentes comprometendo a longevidade e a capacidade fecundante do sêmen congelado-descongelado.

A avaliação do sêmen criopreservado visa determinar o grau de injúria provocado pelo processo de congelamento e descongelamento. Apesar de não haver um atributo específico do espermatozoide que esteja precisa e altamente correlacionada com a fertilidade de um sêmen, a análise conjunta de suas diferentes características permite obter um valor preditivo da sua capacidade fecundante (Peña 2004). Dentre essas características, a motilidade, morfologia, integridade de membrana e longevidade são as mais comumente acessadas.

Apesar da motilidade ser apenas uma das muitas características de um espermatozoide com capacidade fecundante, sua aferição é o parâmetro mais empregado na avaliação da viabilidade espermática (Peña 2004). Geralmente a motilidade espermática é avaliada subjetivamente, por meio da análise visual do sêmen sob microscópio óptico, utilizando objetivas de menor aumento (10 ou 20x). A estimativa visual da porcentagem de espermatozoides móveis apresenta a vantagem de ser um método simples, rápido e barato, entretanto é altamente subjetivo e não permite avaliar a fertilidade.

De acordo com Oettlé (1993), a fertilidade de um sêmen é adversamente comprometida quando a proporção de espermatozoides morfologicamente normais é abaixo de 60%. Morton & Bruce (1989) observaram ainda uma nítida correlação positiva entre a

morfologia normal e motilidade espermática em que espermatozóides apresentando defeitos morfológicos tenderam a ser imóveis enquanto que espermatozóides normais tenderam a ser móveis. Embora no sêmen fresco essa correlação não seja tão evidente, esta se torna aplicável no sêmen congelado-descongelado. A morfologia espermática pode ser avaliada através de preparações úmidas de células fixadas e não coradas em microscópios de contraste de fase ou de interferência diferencial ou através de esfregaços utilizando-se corantes vitais (eosina-nigrosina, azul de tripan, vermelho congo, rosa de bengala, wright, giemsa, Diff-Quik®, Spermac®). O acrossoma do espermatozóide canino pode ser analisado pela microscopia óptica em esfregaços corados com eosina-nigrosina, giemsa, rosa bengala e Spermac®. Combinações de azul de tripan e giemsa ou azul de tripan, marrom de Bismarck e rosa de bengala permitem avaliar defeitos acrossomais juntamente com a morfologia (Peña 2004).

Tanto a motilidade, como a morfologia podem ser avaliadas subjetivamente, utilizando apenas um microscópio óptico. Outra ferramenta para a avaliação espermática são os sistemas de análises de sêmen computadorizados (Computerized Assisted Sperm Analysis – CASA) que permitem a obtenção de informações objetivas e precisas a respeito da proporção de células móveis em uma amostra de sêmen bem como da qualidade desses movimentos, a concentração e a morfologia (Peña 2004).

A integridade da membrana plasmática é essencial para a capacidade fertilizante do espermatozóide (Rijsselaere et al. 2005), além da sua importância para o metabolismo espermático (Silva 2005). Até recentemente, a integridade da membrana plasmática era rotineiramente acessada através dos corantes vitais (eosina-nigrosina, azul de tripan). Contudo, o principal problema dessa técnica é que os espermatozóides podem apresentar uma coloração parcial, tornando sua interpretação difícil e altamente subjetiva. Ademais, vários ingredientes, tais como o GL ou glóbulos de gordura podiam interferir nessas colorações. Mais recentemente, a integridade da membrana plasmática tem sido avaliada também através de corantes fluorescentes (diacetato de carboxifluoresceína, iodeto de propídio, SYBR-14 combinado com o iodeto de propídio, o carboxi-SNARF, a calceína-AM associada ao homodímero etídio e o Hoeschst 33258) em microscopia de epifluorescência. Tanto o CFDA quanto o SYBR-14 são compostos não-fluorescentes permeáveis à membrana, convertendo-se em fluoróforos verdes impermeáveis, ficando retidos no interior das células com membranas íntegras. Com a morte celular, o espermatozóide perde sua habilidade de reter o influxo do corante vermelho iodeto de propídio, substituindo a carboxifluoresceína ou SYBR-14 dentro da célula. Já a integridade funcional da membrana plasmática pode ser avaliada através do teste hiposmótico (HOST) (Peña 2004; Cardoso et al. 2005a). O princípio

deste teste baseia-se no enrolamento da cauda do espermatozóide íntegro, indicando aqueles que permitiram a entrada, porém não a saída, de água através de suas membranas, quando incubados em uma solução hiposmótica (Kumi-Diaka 1993). Em humanos, o HOST tem sido correlacionado com a motilidade espermática, viabilidade, testes de penetração espermática e fertilização *in vitro*, embora alguns pesquisadores tenham obtido resultados questionando essa correlação (Hishinuma & Sekine 2003). Em cães, os relatos também são controversos com alguns autores obtendo boas correlações entre o HOST e a motilidade (Kumi-Diaka 1993; Rodriguez-Gil et al. 1994; Pinto & Kozink 2008) e viabilidade espermática (Rodriguez-Gil et al. 1994; Pinto & Kozink 2008) e outros afirmando que apesar do alto grau de confiabilidade do teste, não haveria correlação com a motilidade (England & Plummer 1993).

Outro teste utilizado para avaliar a integridade funcional dos espermatozóides, estimando o seu potencial fertilizante, é o da interação dos mesmos à zona pelúcida isolada (Holt 2000). Esta ligação é mediada por meio de receptores presentes na membrana plasmática do espermatozóide e uma ou mais glicoproteínas da zona pelúcida consistindo em uma etapa crucial no processo de fertilização (Rijsselaere et al. 2005). Acredita-se que esse teste permite a detecção de danos a nível molecular que não podem ser aferidos através de técnicas convencionais de análises de sêmen (Rijsselaere et al. 2005). Ivanova et al. (1999) estudaram o efeito da criopreservação sobre a capacidade de ligação dos espermatozóides canino à zona pelúcida e observaram que o sêmen do animal com maior decréscimo nos parâmetros espermáticos pós-descongelamento correspondeu àquele de menor atividade de ligação à zona pelúcida.

A reação acrossomal é um dos pré-requisitos para a penetração do espermatozóide no oócito. Com a fusão da membrana espermática à membrana acrossomal externa, o espermatozóide libera seu conteúdo enzimático, através de mecanismos de exocitose, permitindo-o penetrar na zona pelúcida (Rijsselaere et al. 2005). O status acrossomal pode ser determinado utilizando-se corantes não fluorescentes (eosina-nigrosina, Giemsa, azul de tripan/marrom de Bismark/rosa de bengala ou Spermac®) ou fluorescentes (lecitinas conjugadas com fluoresceínas tais como a aglutinina de *Pisum sativum*, aglutinina de *Arachis hypogaea*). Espermatozóides com acrossoma íntegro apresentam fluorescência ao longo de toda a região acrossomal enquanto que aqueles com acrossoma reagido não apresentam sequer o contorno acrossomal.

A avaliação da longevidade dos espermatozóides após a descongelamento pode ser feita através do teste de termorresistência (TTR). O TTR promove uma simulação parcial *in vitro* do processo *in vivo* visando avaliar a longevidade espermática que o sêmen teria no

interior do trato reprodutor da fêmea. Acredita-se também que a sobrevivência espermática *in vitro* seja um parâmetro importante para a estimativa da capacidade fecundante do sêmen canino (Rota et al. 1999). Em suínos e humanos, estimativas da motilidade após a incubação a temperaturas corporais têm dado melhores indicativos da capacidade fecundante do que simples avaliações da motilidade imediatamente após a descongelação (Thirumala et al. 2003; Kashiwazaki et al. 2006). Em sentido contrário, Olar (1984, apud Ström et al. 1997) sugere que a avaliação da motilidade espermática canina imediatamente após a descongelação pode ser mais importante do que a sobrevivência espermática após o período de incubação. Rota et al. (1999) também não encontraram relação entre a capacidade fecundante do sêmen e sua sobrevivência *in vitro*. Já Strom et al. (1997) afirmaram que uma baixa termorresistência não estaria necessariamente associada com baixa fertilidade na espécie canina, uma vez que o sêmen congelado com o método comercial CLONE apresentou uma alta porcentagem de motilidade espermática após a descongelação (74%), baixa termorresistência (20% após uma hora de incubação a 37°C) e mostrou altos índices de fertilidade após inseminação vaginal (59,3%) e intra-uterina (86,4%) (Govette et al. 1996 apud Ström et al. 1997). Esses mesmos autores ainda acreditam que a termorresistência pós-descongelação pode ser mais baixa para o espermatozóide canino do que para outras espécies. Concannon & Battista (1989) sugerem que o TTR deve ser usado mais freqüentemente para avaliar as técnicas de congelamento. De modo geral, as amostras de sêmen são submetidas a períodos de duas a seis horas de incubação, nas temperaturas de 37 a 39°C (Ström et al. 1997; Peña et al. 1998a; Rota et al. 1998).

Nenhuma destas técnicas permite uma avaliação completa de todos os parâmetros espermáticos de forma que a associação de diferentes testes é importante para obter uma estimativa dos danos causados pelos diversos protocolos de criopreservação espermática.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; LEE, D.S.; SANO, H. et al. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. **The Journal of Reproduction and Development**, doi:10.1262/jrd.19148, 2008.

AISEN EG, MEDINA VH, VENTURINO A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. **Theriogenology**, v. 57, n. 7, p. 1801-1808, 2002.

ÁLAMO, D.; BATISTA, M.; GONZALEZ, F. et al. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 degrees °C as a viable alternative to liquid nitrogen. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 72-82, 2005.

ALHAIDER, A.K.; WATSON, P.F. Cryopreservation of dog semen: The effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. **Animal Reproduction Science**, doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.011, 2008.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 105–113, 2005.

BATISTA, M.; ÁLAMO, D.; GONZALEZ, F. et al. Influence of the freezing technique (nitrogen liquid vs ultrafreezer of -152 degrees C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.423-428, 2006.

BAUST, J.M.; VAN BUSKIRK, R.; BAUST, J.G.. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 36, n. 4, p. 262-270, 2000.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F. et al. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 632–638, 2008.

BLENDINGER, K. [2007]. Techniques of artificial insemination by fresh, chilled and frozen semen. **Proceedings of the SCIVAC Congress**, Rimini, Italy, 2007 87 – 89. Disponível em: < http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2007/blending3_en.pdf?LA=6 > Acesso em: 31/05/2008.

BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. et al. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. I - Efeito do meio diluidor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.3, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000300016&lng=pt&nrm=iso> Acesso em: 25/05/2008.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHÔA, D.C. et al. Canine semen freezing using a egg yolk-glycerol-coconut water extender. **Ciência Animal**, v. 10, n. 1, p. 29-36, 2000.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M.. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n. 3-4, p. 179-187, 2005a

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M.. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 4, p. 257-262, 2005b

CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; MEDEIROS, A.S.L. et al. Improvement of stallion semen post-thaw motility with the association dimethyl formamide. **Animal Reproduction Science Abstracts**, v. 89, n. 1-4, p. 286, 2005.

CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P. et al. Cryoprotector action of the glycerol and ethylene glycol in the freezing of the dog semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 174–176, 2002.

CASSANI, P.; BECONI, M.T.; O'FLAHERTY, C.. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1-2, p. 163-173, 2005.

CHALAH, T.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. et al. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 185-191, 1999.

CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.M.; SOUZA, F.F.S. et al. Morphofunctional characteristics of canine cooled and frozen semen using two different extenders. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 407–415, 2006.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M.. Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk RW. (Ed.). **Current veterinary therapy**. Philadelphia: WB Saunders, 1989. p.1247-1259.

De LEEUW, F.E.; De LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 30, n. 1, p. 32-44, 1993.

DOBRINSKI, I.; LULAI, C.; BARTH, A.D. et al. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 47, p. 291-296, 1993.

DURRANT, B.S.; RAVIDA, N., SPADY, T. et al. New technologies for the study of carnivore reproduction. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1729–1736, 2006.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 47, p. 243-255, 1993.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 251-260, 1996.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 375-387, 2000.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. In: FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W (Ed.) **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: Saunders, 2004. p.1005-1013.

FIDELIS, A.A.G.; POLIDORO, R.F.Q.; BLUME, H. et al. Dimetil-formamida na criopreservação de sêmen ovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, supplement 1, p. 275, 2006.

FOOTE, R.H.. Extenders for freezing dog semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 37-40, 1964.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 277-299, 2002.

GOODROWE, K.L.; WALKER, K.L.; RYCKMAN, K.L.. et al. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 389-403, 2000.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, n. 1, p. 26-38, 1992.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P.. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, n. 1, p. 247-252, 1980.

HATAMOTO, L.K.; BAPTISTA SOBRINHO, C.A.; NICHI, M. et al. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1610-1614, 2006.

HISHINUMA, M.; SEKINE, J.. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 7, p. 817-820, 2003.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000.

HORI, T.; KASEKI, H.; FUKUHARA, Y. et al. Effects of addition of sodium lauryl sulfate on frozen-thawed canine spermatozoa. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 10, p. 1125-8, 2006.

IVANOVA, M.; MOLLOVA, M.; IVANOVA-KICHEVA, M.G. et al. Effect of cryopreservation on zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, p. 163-170, 1999.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Semen collection, evaluation, and preservation. In: JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. (Ed.) **Canine and feline theriogenology**. 1ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.287–306.

KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y. et al. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 4, p. 511–516, 2006.

KIM, Y.J.; PARK, Y.J.; KIM, B.J. et al. Artificial insemination with frozen semen in the dog – simple freezing method using methanol. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 4, p. 881-90, 1994.

KUMI-DIAKA, J.. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.

LUKASZEWICZ, E. An effective method for freezing White Italian gander semen. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 19-27, 2002.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. **Theriogenology**, v. 66 n. 9, p. 2047–2055, 2006.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A.. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. **Theriogenology**, v. 68, n. 8, p. 1088–1096, 2007.

MCLAUGHLIN, E.A.; FORD, W.C.; HULL, M.G.. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**; v. 95, n. 3, p. 749–754, 1992.

MCNIVEN, M.A.; GALLANT, R.K.; RICHARDSON, G.F.. Dimethyl-acetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, n. 5, p. 943-948, 1993.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T. et al. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 273-276, 2002a.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology** 57:327-344, 2002b.

MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204–212, 2007.

MORTON, D.B.; BRUCE, S.G.. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 39, p. 311–316, 1989.

MOUSSA, M.; MARTIBE, V., TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins extract from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695-1706, 2002.

NÖTHLING, J.O.; GERSTENBERG, C.; VOLKMANN, D.H.. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – a retrospective study. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 66, n. 2, p. 49-55, 1995.

OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 47, p. 257–260, 1993.

OGIER DE BAULNY, B.; LABBE, C.; MAISSE, G.. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 177–184, 1999.

OKANO, T.; MURASE, T.; ASANO, M. et al. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 11, p. 1359-1364, 2004.

OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S. et al. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese White Rabbit. **Experimental Animals**, v. 56, n. 1, p. 29–34, 2007.

OLAR, T.T.; BOWEN, R.A.; PICKETT, B.W.. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v. 31, n. 2, p. 451-461, 1989.

OLIVEIRA, Érika Cristina Santos. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação de sêmen canino**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, 2003. 60p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

OLIVEIRA, J.V.L.; BARRETO, C.S.; RIBEIRO FILHO, A.L.. Avaliação de sêmen canino pós-descongelamento utilizando-se tris-gema e lactose-gema em quatro diferente período de equilíbrio. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 308-309, 1999.

PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, A. et al. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 163-174, 1998a.

PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, A. et al. Effects of sodium dodecyl sulphate on post-thaw dog semen quality during in vitro incubation at 39°C and 22°C. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, n. 6, p. 393-398, 1998b.

- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, A. et al. Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, n.1, p. 5-9, 1998c.
- PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C.. Effects of Equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 859-875, 2000.
- PEÑA, A.I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 209–224, 2004.
- PEÑA, F.J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J.M.. Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, Suppl. 2, p. 21–29, 2006.
- PETER, A.T.; LINDE-FORSBERG, C.. Efficacy of the anticaspase agente zVAD-fmk on post-thaw viability of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1525-1532, 2003.
- PINTO, C.R.F.; KOZINK, D.M.. Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2-4, p. 450–455, 2008. (Short communication)
- POLGE, C.; ROWSON, L.E.A.. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79 8C. **Nature**, v. 169, n. 169, p. 626–627, 1952.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKER, A.S.. Revival of spermatozoa after vitrification at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666–667, 1949.
- PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K.. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 69, n. 6, p. 666–672, 2008.
- RIGAU, T.; FARRÉ, M.; BALLESTER, J. et al. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. **Theriogenology**, v. 56, n. 5, p. 815-829, 2001.
- RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S. et al. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 706-719, 2005.
- RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T.. Effects of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, n. 5, p. 815-829, 1994.
- ROHLOFF, D.; LAIBLIN, C.; HEIDRICH, S.. Cryoprotective ability of glycerin and DMSO in the deep freezing of dog sperm. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 91, n. 2, p. 31-33, 1978.
- ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. et al. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without equex stm paste. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1045-1058, 1999.

ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J. et al. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, n. 5, p. 355-361, 1998.

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G. et al. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1848–1858, 2006.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. et al. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1093 – 1101, 1997.

ROTA, A.; ROTA, A.; MARTINE, M. et al. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. **Reproduction, nutrition, development**, v.45, n. 1, p.29-37, 2005.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C.. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 3-4, p. 185-249, 1995.

SANTOS, S.E.C.; VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S. et al. Comparison of two cryoprotectants for freezing dog semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 472-473, 2001.

SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E. et al. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 173–182, 2006.

SILVA, Alessandra Ferreira. **Uso da dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino**. Viçosa: Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2004. 57f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, 2004.

SILVA, A.R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.119-127, 2007.

SILVA, Alexandre Rodrigues. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos**. Fortaleza: Faculdade de Veterinária, 2005. 165f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, 2005.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.. Canine semen's freeze with different concentrations of egg yolk and glycerol in TRIS and coconut water extenders. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1021-1025, 2000.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.. Canine semen cryopreservation: review. **Ciência Animal**, v.11, n. 2, p. 119-129, 2001.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 1, p. 74–78, 2006.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.S.C.; UCHÔA, D.C. et al. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **The Veterinary Journal**, v.164, n. 3, p.244-246, 2002.

SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P.. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 44, n. 4, p. 571-579, 1995.

SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A. et al.: Ethylene glycol on canine sêmen cryopreservation. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 649–655, 2002.

SOSEF, M.D.; BAUST, J.M.; SUGIMACHI, K. et al. Cryopreservation of Isolated Primary Rat Hepatocytes Enhanced Survival and Long-term Hepatospecific Function. **Annals of Surgery**, v. 241, n. 1, p. 125–133, 2005.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1056–1065, 2004.

STRÖM, B.; ROTA A.; LINDE-FORSBERG, C.. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology** v. 48, n. 2, p. 247-256, 1997.

THIRUMALA, S.; FERRER, M.S.; AL-JARRAH A. et al. 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.

TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS E.. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v. 78, n. 4, p. 586–90, 1999.

VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P.. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.

VERSTEGEN, .JP.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA M.. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 720–733, 2005.

WATSON, P.F.. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 7, n. 1, p. 871–891, 1995.

WEISS, R.R.; RODASKI, S.; BÜCHELE, J.M. et al. Estudo preliminar de algumas características do sêmen canino congelado. **Archives of Veterinary Science** 5, p. 67-71, 2000.

WITTE, T.S.; SCHÄFER-SOMI, S.; KUCHAR, A. et al. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science** doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.022, 2008.

YAGI, T.; HARDIN, J.A.; VALENZUELA, Y.M. et al. Caspase Inhibition Reduces Apoptotic Death of Cryopreserved Porcine Hepatocytes. **Hepatology**, v. 33, n. 6, p. 1432-1440, 2001.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M. et al. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p.579-585, 2000.

ZIMMERMANN, M.; SANTOS, T.E.; FIDELIS, A.A.G. et al. The use of dimethyl formamide and coconut water in canine semen cryopreservation. **Revista Bioscience Journal** 23, n. 1, p. 96–100, 2007.

<<http://en.wikipedia.org/wiki/Amide>> Acesso: em: 08/06/2008.

CAPÍTULO 2

USO DE GLICEROL, METIL-FORMAMIDA E DIMETIL-FORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES DO SÊMEN CANINO

RESUMO

A crescente demanda por biotécnicas reprodutivas em cães tem despertado grande interesse no desenvolvimento de protocolos de congelação de sêmen canino que, associados à correta identificação do momento ótimo para a inseminação, resultem em taxas de fertilidade próximas às da inseminação artificial com sêmen fresco ou resfriado. A grande vantagem da congelação do sêmen é a sua viabilidade por tempo indeterminado. O crioprotetor de eleição na congelação do sêmen canino é o glicerol, entretanto a busca por crioprotetores alternativos tem sido crescente. O presente trabalho objetivou comparar a eficiência da metil-formamida (MF) e da dimetil-formamida (DF) em relação ao glicerol (GL) como crioprotetores na congelação do sêmen canino. Para o experimento, foram utilizados *pools* de amostras de sêmen de 5 cães da Polícia Federal, coletadas por manipulação digital. Cada *pool* foi fracionado em 3 amostras, sendo cada uma delas submetida a um dos 3 crioprotetores, sempre à concentração final de 3% em diluidor Tris-gema. Cada tratamento foi repetido 5 vezes. O sêmen foi avaliado subjetivamente quanto à motilidade total e progressiva, vigor e morfologia logo após a coleta do sêmen, formação do *pool*, diluição, resfriamento e descongelação. As alíquotas foram resfriadas e equilibradas a 4°C por uma hora e meia e envasadas em palhetas de 0,5mℓ. Em seguida, procedeu-se a congelação, expondo-se as palhetas ao vapor de nitrogênio líquido por 15 minutos seguido de imersão e armazenamento no nitrogênio líquido. As palhetas foram acondicionadas em botijão criogênico por um período mínimo de sete dias antes da descongelação. A descongelação foi feita em banho-maria a 37°C durante um minuto, permanecendo a esta temperatura durante 30 minutos para a realização do teste hiposmótico (HOST). A longevidade espermática foi feita realizando-se o teste de termorresistência (TTR). A análise estatística foi realizada utilizando-se análises de variância (ANOVA) e teste PLSD de Fischer. As amostras de sêmen fresco apresentaram características físicas e morfológicas dentro da normalidade ($93,60 \pm 7,60\%$, $90,40 \pm 8,70\%$, $4,8 \pm 0,44$ e $90,25 \pm 3,17\%$ para motilidade total, motilidade progressiva, vigor e morfologia normal,

respectivamente). Após a descongelação, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre GL e DF em relação à motilidade total e progressiva e vigor. Em relação à MF, não houve diferenças significativas em relação ao GL ou à DF em nenhum parâmetro avaliado. As médias para motilidade total, motilidade progressiva, vigor e morfologia normal na pós-descongelação foram $69,00 \pm 5,47\%$, $61,00 \pm 7,41\%$, $2,9 \pm 0,54\%$ e $57,10 \pm 5,01\%$ para o GL, $59,00 \pm 8,94\%$, $50,00 \pm 10,00\%$, $2,5 \pm 0,70$ e $66,90 \pm 7,74\%$ para a MF e $44,00 \pm 21,03\%$, $37,00 \pm 19,87\%$, $2,1 \pm 0,65$ e $61,10 \pm 5,59\%$ para a DF, respectivamente. No teste HOST, o GL apresentou-se superior à MF e DF ($57,80 \pm 12,47\%$, $35,80 \pm 18,47\%$ e $34,40 \pm 9,40\%$, porcentagens médias de células com membranas íntegras para GL, MF e DF, respectivamente). Durante o TRT, não houve diferenças entre o GL e a MF e ambos mostraram-se superior à DF. De acordo com os resultados encontrados, pode-se concluir que a MF apresenta resultados semelhantes ao GL, exceto no HOST, e, portanto pode ser considerada uma alternativa como crioprotetor na criopreservação de sêmen canino. Testes comparando diferentes concentrações da MF são necessários visando seu melhor desempenho como crioprotetor.

Palavras-chave: crioprotetores, amidas, congelação-descongelação, sêmen, cão.

ABSTRACT

Due to an increasing demand for canine reproductive biotechnologies, it has been crescent interests for improving freezing protocols employed for canine semen which, associated to a correct identification of optimal breeding time, results on fertility rates close to those achieved with artificial insemination with fresh or cooled semen. The unlimited viability of cryopreserved semen is the greatest advantage of this technique. Glycerol is the most commonly used cryoprotectant for dog sperm however the search for alternative cryoprotectants has increased. The aim of the present work was to compare the efficiency of methyl-formamide (MF), dimethyl-formamide (DF) and glycerol (GL) as cryoprotectants in canine semen cryopreservation. Five dogs were used in the experiment. Ejaculates were collected, *pooled* and divided into three aliquots and each one was submitted to one of the three cryoprotectants, with final concentration of 3% in egg yolk-TRIS extender. Treatments were repeated five times. Semen was subjectively evaluated for total and progressive motility, vigor and morphology immediately after each of the following procedures: semen collection, *pool* formation, dilution, chilling and freezing/thawing. Sperm membrane functional integrity was assessed by hypo-osmotic swelling test (HOST), and longevity was assessed using the thermoresistance test (TRT). Fresh semen showed normal physical and morphological characteristics. After thawing, differences were observed between semen frozen using GL and DF regarding total and progressive motility and vigor ($P < 0.05$) but not between MF and GL or MF and DF. Means for total motility, progressive motility, vigor and morphologically normal spermatozoa were respectively $69.0 \pm 5.4\%$, $61.0 \pm 7.4\%$, 2.9 ± 0.5 and $57.1 \pm 5.0\%$ for GL, $59.0 \pm 8.9\%$, $50.0 \pm 10.0\%$, 2.5 ± 0.7 and $66.9 \pm 7.7\%$ for MF and $44.0 \pm 21.0\%$, $37.0 \pm 19.8\%$, 2.1 ± 0.6 and $61.1 \pm 5.5\%$ for DF. On HOST, GL was superior to MF and DF ($57.8 \pm 12.4\%$, $35.8 \pm 18.4\%$ and $34.4 \pm 9.4\%$, respectively). During TRT, both GL and MF were superior to DF, with no differences between GL and MF. In conclusion, the use of MF as cryoprotectant

showed results similar to GL, except on HOST, and can be considered as an alternative in canine semen cryopreservation. Further studies testing different concentrations of MF may improve its effects on cryopreservation of canine semen.

Keywords: cryoprotectant agents, amides, freezing/thawing, sperm, dog.

1. INTRODUÇÃO

Tem sido cada vez maior a procura por biotecnologias aplicadas à reprodução de cães por parte de criadores e proprietários, bem como por instituições como polícia, corpo de bombeiros e associações de deficientes visuais, cujos animais possuem determinadas características desejáveis para o desempenho de suas atribuições. Além disso, devido à proximidade filogenética, o cão doméstico tem sido considerado um útil modelo experimental para outras espécies canídeas (Peña et al. 1998; Goodrowe et al. 2000; Farstad 2000; Gobello & Corrada 2003) e ursídeas (Durrant et al. 2006). Comercialmente, as biotécnicas mais utilizadas na reprodução assistida em cães domésticos têm se limitado principalmente à inseminação artificial e à preservação do sêmen, sendo que outras tecnologias mais avançadas encontram-se mais restritas ao campo experimental (Gobello & Corrada 2003).

A criopreservação permite o armazenamento do material por tempo indeterminado. Os protocolos utilizados na criopreservação do sêmen canino surgiram a partir da adaptação empírica dos protocolos empregados na criopreservação de sêmen bovino (Silva et al. 2001). Dessa forma, o glicerol (GL) é o crioprotetor mais utilizado para a congelação de sêmen canino. Enquanto que na indústria bovina o GL é empregado em um protocolo de criopreservação único e bem estabelecido, em cães podemos observar uma diversidade de concentrações de GL empregada (de 1 a 16%), diferentes diluidores e diferentes métodos. Todas essas variações nos protocolos resultam em uma grande diversidade nas taxas de motilidade obtidas após a descongelação (22 a 75%) para o sêmen canino criopreservado (Olar et al. 1989; Strom et al. 1997; Peña et al. 1998; Rota et al. 1998; Silva et al. 2000; Okano et al. 2004).

Vários estudos investigaram os efeitos de diferentes diluidores (Olar et al. 1989; Silva & Verstegen 1995; Ivanova-Kicheva et al. 1997; Cardoso et al. 2000; Schäfer-Somi et al. 2006) e protocolos de congelação (Strom et al. 1997; Peña & Linde-Forsberg

2000; Okano et al. 2004; Schäfer-Somi et al. 2006; Silva et al. 2006a) na criopreservação do sêmen canino. Entretanto, trabalhos comparando o GL com outros crioprotetores para a congelação do sêmen de cão ainda são raros e inconsistentes. Visando encontrar um crioprotetor alternativo para o sêmen canino, alguns trabalhos testaram diferentes substâncias tais como o dimetilsulfóxido (DMSO) e etileno glicol (EG), ambos usados sozinhos ou em combinação com o GL (Rohloff et al. 1978; Olar et al. 1989, Santos et al. 2001; Cavalcanti et al. 2002; Soares et al. 2002; Rota et al. 2006; Martins-Bessa et al. 2006). Entretanto, os resultados mostraram que esses crioprotetores são similares (Santos et al. 2001; Soares et al. 2002; Rota et al. 2006; Martins-Bessa et al. 2006) ou mesmo piores (Rohloff et al. 1978; Olar et al. 1989; Cavalcanti et al. 2002) que o GL.

As amidas representam uma classe de crioprotetores alternativos para a congelação de sêmen e têm sido freqüentemente utilizadas como na criopreservação de sêmen equino, especialmente para aqueles garanhões cujo sêmen apresenta resultados insatisfatórios quando o GL é empregado (Medeiros et al. 2002; Gomes et al. 2002; Squires et al. 2004; Alvarenga et al. 2005; Carmo et al. 2005). Mais recentemente, as amidas foram testadas também para a criopreservação de sêmen suíno (Bianchi et al. 2008). Em cães, poucos trabalhos avaliaram o efeito das amidas na criopreservação do sêmen. (Oliveira 2003; Chirinéa et al. 2006; Zimmermann et al. 2007). Contudo, esses estudos avaliaram o uso da dimetil-formamida (DF) associada a outros crioprotetores e a diferentes meios diluidores e, até o presente momento, não há um estudo mostrando o efeito específico das amidas na congelação de sêmen canino. Ademais, a metil-formamida (MF) nunca foi testada na criopreservação do sêmen de cão. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da MF e da DF comparando com o GL na criopreservação do sêmen canino.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados como doadores de sêmen, quatro cães da raça Retriever do Labrador e um cão da raça Springer Spaniel do Canil Central da Polícia Federal de Brasília, com idades entre dois e sete anos. Os animais foram selecionados mediante exames clínicos e andrológicos completos e condicionados à coleta por manipulação digital. Os animais eram mantidos em canis individuais com solário, recebendo ração comercial uma vez ao dia e água *ad libitum*. Semanalmente, os cães eram pesados e examinados pelo médico veterinário responsável e a quantidade de ração ajustada de acordo com as necessidades de cada animal.

2.2 Meios diluidores

Uma solução base de Tris-gema foi preparada contendo 3,028g de Tris, 1,78g de ácido cítrico, 1,25g de frutose (todos da Vetec Química, Duque de Caxias, RJ, Brasil), diluídos em 100ml de água destilada. Em seguida, foi adicionada a gema de ovo a uma concentração de 20% da solução (Silva et al. 2000). A partir dessa solução base foram adicionados o GL, a MF e a DF (todos da Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), de modo que a concentração do crioprotetor no diluidor fosse de 6%, decrescendo para uma concentração final de 3% de crioprotetor após a diluição com o sêmen, constituindo dessa maneira, os diferentes tratamentos (GL, MF e DF, respectivamente).

2.3 Coleta do sêmen

Para a realização do experimento, foram feitas cinco repetições durante três semanas. Para cada repetição, sêmen de três cães foram coletados para formar o *pool*. A coleta do sêmen foi feita através da técnica de manipulação digital, expondo-se o bulbo peniano e coletando o ejaculado através de funil plástico acoplado a um tubo de centrífuga plástico. As primeiras e a segunda frações espermáticas eram identificadas pela mudança de coloração do ejaculado e coletadas separadamente. As coletas foram realizadas por uma mesma pessoa em uma sala de procedimentos, contando com o auxílio de tratadores já habituais aos cães.

Logo após a coleta, o tubo contendo a segunda fração espermática foi acondicionado em banho-maria a 30°C permanecendo desta forma durante todo o processo de coleta de sêmen e avaliação espermática dos outros animais até o início do processamento do sêmen, por um período máximo de 30 minutos. Após a coleta e análise de sêmen de todos os animais, apenas os ejaculados que apresentassem padrões mínimos de 75% de motilidade progressiva e vigor 4 foram misturados formando o *pool*.

2.4 Processamento do sêmen

Após a formação e avaliação, o *pool* foi dividido em três alíquotas de 0,5ml e a cada alíquota foi adicionado 0,5ml de um dos meios diluidores, também a 30°C, resultando em uma diluição de uma parte sêmen:uma parte diluidor (1:1). As amostras foram resfriadas e equilibradas a 4°C por uma hora e meia, seguido de envase em palhetas de 0,5ml, também resfriadas a 4°C. Em seguida, procedeu-se à congelação, expondo-se as palhetas ao vapor de nitrogênio líquido. Estas foram colocadas horizontalmente sobre uma grade metálica dentro de uma caixa de isopor, a uma altura de 4cm do nível de nitrogênio líquido durante 15 minutos e após esse período foram submersas em nitrogênio líquido e acondicionadas em botijão criogênico por um período mínimo de sete dias antes da descongelação.

2.5 Descongelamento

O processo de descongelamento foi realizado segundo adaptação do protocolo utilizado por Silva et al. (1998). As amostras foram retiradas do botijão criogênico, suspensas no ar por 10 segundos e imersas em banho-maria a 37°C por um minuto.

Em seguida, o sêmen foi acondicionado em tubos tipo Eppendorf e mantido em banho-maria a 37°C para as avaliações seminais.

2.6 Avaliações seminais

As análises seminais incluíram avaliações das características macroscópicas (aspecto, volume e cor) e microscópicas (motilidade total, motilidade progressiva e vigor) do sêmen. As análises microscópicas foram feitas colocando-se uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, aquecidas a 37°C em placa aquecedora e avaliadas através de microscopia óptica em aumento de 200x.

A motilidade total e progressiva foram avaliadas subjetivamente expressando a porcentagem de espermatozoides móveis (0 a 100%) e o vigor espermático foi qualificado numa escala de 0 (imóveis) a 5 (motilidade rápida). Os parâmetros de motilidade total e progressiva e vigor espermático foram avaliados após a coleta individual de cada cão, formação do *pool*, diluição, resfriamento, imediatamente após a descongelamento e durante o teste de termorresistência (TTR). Imediatamente após a formação do *pool* foi retirada uma amostra para determinação da concentração e morfologia espermáticas em diluição 1:100 em solução de formol-salina.

Para a determinação da concentração espermática realizou-se a contagem de espermatozoides em câmara hematómica (câmara de Neubauer) em microscópio de contraste de fase em aumento de 400x (Johnston et al. 2001).

As alterações morfológicas foram avaliadas após a formação do *pool*, diluição, resfriamento e imediatamente após a descongelamento, em preparação úmida sob microscopia de contraste de fase e aumento de 1000x, em imersão. Foram contadas 200 células e os defeitos morfológicos divididos em defeitos maiores e menores de acordo com Oettlé (1993).

O TTR foi realizado após a descongelamento, de acordo com Ström et al. (1997), e consistiu em avaliações da motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático aos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após a descongelamento (grupos T0, T15, T30, T45, T60, T90, T120, T150 e T180, respectivamente) ou até que todos os espermatozoides estivessem imóveis.

Para a avaliação da integridade e funcionalidade da membrana plasmática após a descongelamento foi realizado o teste hiposmótico (HOST) (Kumi-Diaka 1993). Para tanto, utilizaram-se 100µl do sêmen descongelado acrescido de 900µl de solução de frutose (13,5g/l) e citrato de sódio (7,35g/l) à pressão osmótica de 150mOsm/l e incubou-se em banho-maria a 37°C durante 30 minutos. Passado este período, as amostras foram avaliadas quanto à presença ou não de cauda enrolada contando-se 200 células em microscópio óptico em aumento de 200x (England & Plummer 1993).

2.7. Análise estatística

Os valores em porcentagens da motilidade total e progressiva, morfologia, do TTR e do HOST foram transformados para arco seno da raiz quadrada. Os valores de vigor foram transformados para raiz quadrada. Os resultados observados em cada etapa do processamento do sêmen, utilizando os três diferentes crioprotetores, foram comparados entre si. Os dados obtidos no HOST foram comparados entre os três tratamentos. Os resultados do TTR foram comparados utilizando o tempo, o tratamento e sua interação como efeitos fixos. A interação tempo x tratamento foi significativa, e por isso os resultados são apresentados como diferenças entre tratamentos dentro de cada tempo. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste PLSD de Fisher (StatView for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Sêmen fresco

Os ejaculados apresentaram coloração branca opalescente e aspecto leitoso. Os valores médios (\pm DP) dos *pools* de sêmen fresco para volume e concentração foram $2,4\pm 0,1$ ml e $0,7\pm 0,2 \times 10^9$ espermatozoides/ml, respectivamente. Valores (média \pm DP) para motilidade total e progressiva, vigor e morfologia estão descritos nas Tabelas 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4, respectivamente.

3.2 Diluição, resfriamento e pós-descongelção

Não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre o sêmen fresco, diluído e resfriado em nenhum dos três tratamentos para as características seminais de motilidade total e motilidade progressiva. Entretanto, pôde-se observar uma queda esperada das motilidades total e progressiva na pós-descongelção nos três tratamentos quando comparados com o sêmen fresco, diluído ou resfriado (Tabelas 3.1 e 3.2). Apenas no tratamento GL não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) na motilidade progressiva da fase de resfriamento para a pós-descongelção.

Após a descongelção, a motilidade total e progressiva do tratamento GL mostrou-se superior ($P<0,05$) ao tratamento DF. O tratamento MF não diferiu nem do tratamento GL nem do tratamento DF (Tabelas 3.1 e 3.2).

Tabela 3.1. Motilidade total (%) durante o processamento do sêmen usando Glicerol (GL), Metil-formamida (MF) e Dimetil-formamida (DF) como crioprotetores (média \pm SD)

Crioprotetor	Fresco	Diluído	Resfriado	Congelado-descongelado
	93,6 \pm 7,6 ^A			
GL		88,8 \pm 9,2 ^{Aa}	84,0 \pm 6,5 ^{Aa}	69,0 \pm 5,4 ^{Ba}
MF		91,8 \pm 7,1 ^{Aa}	87,0 \pm 7,5 ^{Aa}	59,0 \pm 8,9 ^{Bab}
DF		91,8 \pm 7,1 ^{Aa}	87,0 \pm 5,7 ^{Aa}	44,0 \pm 21,0 ^{Bb}

^{AB} Letras diferentes indicam diferença estatística entre colunas (P<0,05).

^{ab} Letras diferentes indicam diferença estatística entre linhas (P<0,05).

Tabela 3.2. Motilidade progressiva (%) durante o processamento do sêmen usando Glicerol (GL), Metil-formamida (MF) e Dimetil-formamida (DF) como crioprotetores (média \pm SD)

Crioprotetor	Fresco	Diluído	Resfriado	Congelado-descongelado
	90,4 \pm 8,7 ^A			
GL		84,4 \pm 9,9 ^{Aa}	79,0 \pm 6,5 ^{ABa}	61,0 \pm 7,41 ^{Ba}
MF		87,4 \pm 7,8 ^{Aa}	82,0 \pm 7,5 ^{Aa}	50,0 \pm 10,0 ^{Bab}
DF		87,4 \pm 7,8 ^{Aa}	77,0 \pm 10,9 ^{Aa}	37,0 \pm 19,8 ^{Bb}

^{AB} Letras diferentes indicam diferença estatística entre colunas (P<0,05).

^{ab} Letras diferentes indicam diferença estatística entre linhas (P<0,05).

O tratamento GL mostrou uma queda significativa no vigor (Tabela 3.3) imediatamente após a diluição (P<0,05), mas não houve diferença entre as fases de diluição, resfriamento e pós-descongelação. Já a MF e a DF, apesar de não sofrerem essa queda logo após a diluição, apresentaram-na de maneira progressiva e significativa (P<0,05) nas fases de resfriamento e pós-descongelação. Após o resfriamento, o tratamento MF mostrou-se superior (P<0,05) em relação ao GL (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Vigor durante o processamento do sêmen usando Glicerol (GL), Metil-formamida (MF) e Dimetil-formamida (DF) como crioprotetores (média \pm SD)

Crioprotetor	Fresco	Diluído	Resfriado	Congelado-descongelado
	4,8 \pm 0,4 ^A			
GL		3,5 \pm 0,5 ^{Ba}	2,8 \pm 0,4 ^{Ba}	2,9 \pm 0,5 ^{Ba}
MF		4,2 \pm 0,8 ^{Ab}	3,7 \pm 0,2 ^{Bb}	2,5 \pm 0,7 ^{Cab}
DF		4,3 \pm 0,6 ^{Aa}	3,4 \pm 0,5 ^{Bab}	2,1 \pm 0,6 ^{Cb}

^{ABC} Letras diferentes indicam diferença estatística entre colunas (P<0,05).

^{ab} Letras diferentes indicam diferença estatística entre linhas (P<0,05).

Em relação à porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais (Tabela 3.4), não foram encontradas diferenças significativas entre os três tratamentos durante as fases de diluição e resfriamento. Após a descongelação, o tratamento MF foi superior ao GL ($P<0,05$) e o tratamento DF não diferiu de ambos. Comparando com o sêmen fresco, a porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais decresceu em todos os tratamentos após a congelação e descongelação ($P<0,05$). Os tratamentos apresentaram um aumento na porcentagem de defeitos morfológicos secundários ($P<0,05$), a maioria deles relacionados a patologias de cauda.

Tabela 3.4. Porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais durante o processamento do sêmen usando Glicerol (GL), Metil-formamida (MF) e Dimetil-formamida (DF) como crioprotetores (média \pm SD)

Crioprotetor	Fresco	Diluído	Resfriado	Congelado-descongelado
	90.2 \pm 3.1			
GL		86,7 \pm 5,4	82,1 \pm 7,7*	57,1 \pm 5,0 ^{a*}
MF		89,1 \pm 4,2	79,6 \pm 4,4*	66,9 \pm 7,7 ^{b*}
DF		86,5 \pm 5,6	76,0 \pm 8,8*	61,1 \pm 5,5 ^{ab*}

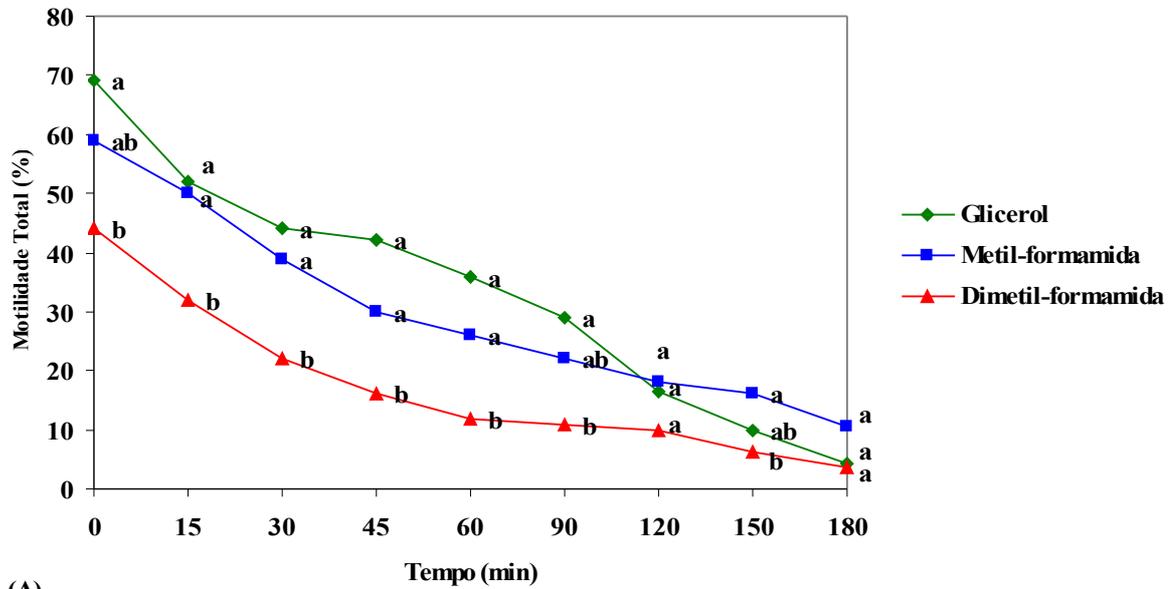
^{ab} Letras diferentes indicam diferença estatística entre linhas ($P<0,05$).

* Diferiram do sêmen fresco ($P<0,05$).

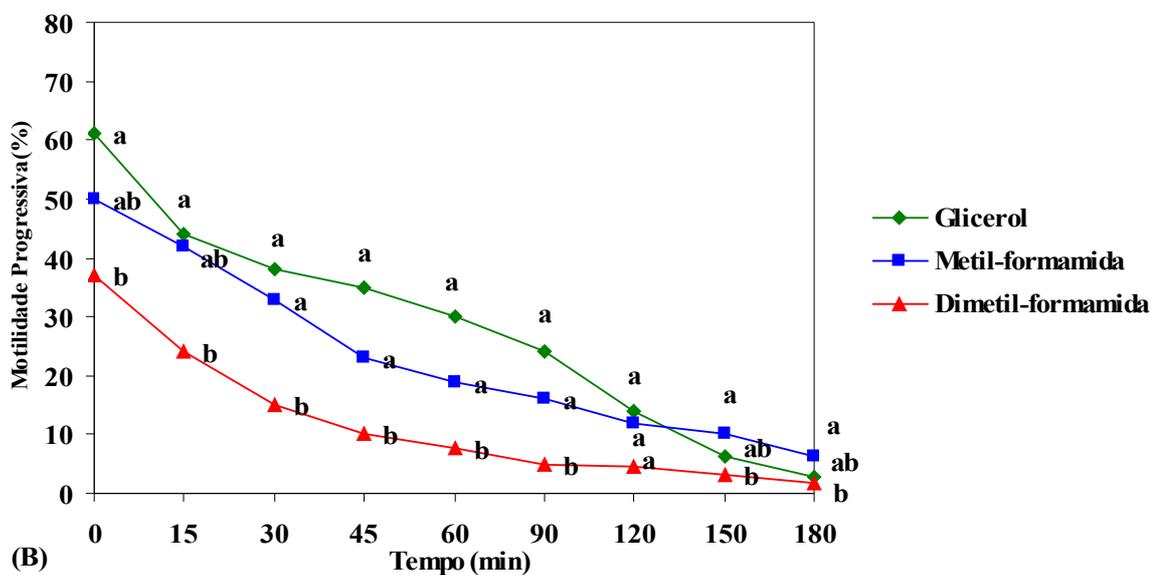
3.3 Teste de termorresistência

Os dados de motilidade total e progressiva nos três tratamentos durante o TTR estão apresentados na Figura 3.1. Durante todo o tempo do TTR, não foram observadas diferenças estatísticas entre o tratamento GL e o tratamento MF. Quando comparado com o tratamento DF, o tratamento MF apresentou uma melhor motilidade total do T15 em diante e uma melhor motilidade progressiva do T30 em diante ($P<0,05$). No T90, os tratamentos MF e DF voltam a não diferir estatisticamente na motilidade total, mas o tratamento GL ainda se manteve superior em comparação ao tratamento DF ($P<0,05$). No T120, o tratamento GL apresentou uma queda mais acentuada da motilidade total, passando a não mais diferir do tratamento DF a partir de então. Desse ponto em diante, o tratamento MF passa a apresentar uma melhor manutenção da motilidade total e progressiva. No T150, o tratamento MF mostrou-se superior ao tratamento DF, mas não ao GL e este não diferiu de ambas na motilidade total e progressiva. No T180, não houve diferenças entre os três tratamentos na motilidade total ($P>0,05$), mas na progressiva a MF ainda foi superior à DF.

Em relação ao vigor, a única diferença observada em todos os tempos avaliados foi no T90, onde o tratamento GL mostrou-se superior em relação ao tratamento DF ($P < 0,05$).



(A)



(B)

Figura 3.1. Avaliação subjetiva durante o teste de termorresistência do sêmen canino pós-descongelamento no uso do GL, MF e DF. (A) Motilidade total; (B) Motilidade progressiva.

^{abc} Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$).

3.4 Integridade funcional da membrana plasmática

Baseado nos resultados do teste HOST, o crioprotetor teve um efeito significativo ($P < 0,05$) na integridade funcional da membrana, sendo o GL o crioprotetor que melhor a preservou ($57,8 \pm 12,4\%$). Entre a MF e a DF não foi observada diferença significativa ($35,8 \pm 18,7\%$ e $34,4 \pm 9,3\%$, respectivamente).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo comparou a eficiência do GL, MF e DF na concentração de 3% na criopreservação do sêmen canino e os resultados obtidos demonstraram que a MF apresenta um efeito crioprotetor similar ao GL nas condições usadas neste trabalho.

Os valores e características encontrados neste trabalho no *pool* do sêmen fresco estão dentro dos padrões de normalidade para a espécie canina de acordo com Feldman & Nelson (2004) e Oettlé (1993). De uma maneira geral, não foram encontradas diferenças significativas na motilidade total e progressiva nos três tratamentos quando comparados o sêmen fresco, diluído e resfriado. Entretanto, no sêmen congelado-descongelado observou-se uma queda na motilidade espermática. Essa queda é um evento esperado uma vez que o próprio resfriamento promove uma redução do metabolismo espermático e a criopreservação resulta em danos às células espermáticas. No vigor, essa queda já pôde ser observada logo na fase de resfriamento, tanto para a MF, quanto para a DF, provavelmente devido à queda no metabolismo promovida pela diminuição da temperatura. No GL, essa queda ocorreu já na fase de diluição, possivelmente devido ao estresse osmótico. Esse estresse osmótico é induzido quando a permeabilidade da membrana a um crioprotetor penetrante é muito mais baixa que a da água. O baixo peso molecular da MF e da DF (59 e 73, respectivamente), comparado com o do GL (92), permite que esses crioprotetores penetrem a membrana espermática mais rapidamente, diminuindo dessa forma, sua toxicidade osmótica quando comparada com o GL (Squires et al. 2004). Baixa viscosidade e boa solubilidade em água são outras características das amidas (Hanada & Nagase 1980; Oliveira 2003; Alvarenga et al. 2005). Essas características podem ser algumas das razões para o sucesso das amidas na criopreservação do sêmen de coelhos (Hanada & Nagase 1980; Kashiwazaki et al. 2006; Okuda et al. 2007), galos (Chalah et al. 1999; Tselutin et al. 1999; Lukaszewicz 2002), peixes (McNiven et al. 1993; Ogier de Baulny et al. 1999) e garanhões cujos sêmens não apresentam

resultados satisfatórios com o uso do glicerol (Gomes et al. 2002; Medeiros et al. 2002; Squires et al. 2004; Carmo et al. 2005).

Trabalhos anteriores com sêmen de cão avaliaram o uso da DF como crioprotetor e a possibilidade de uso em substituição ao GL (Oliveira 2003; Zimmermann et al. 2007). No entanto, vale ressaltar que este é o primeiro trabalho a testar a MF como crioprotetor de sêmen canino. O valor obtido na motilidade progressiva da DF no presente trabalho foi superior ao encontrado por Zimmermann et al. (2007) na concentração de 3,5% ($26,8 \pm 21,4$), mas inferiores à obtida com a concentração de 7% ($46,7 \pm 26$). Contudo, esses mesmos autores observaram um vigor de 2,5 na concentração de 3,5%, similar ao de 2,1 observado no presente trabalho. Já Oliveira (2003) obteve uma motilidade progressiva de 45.5% na pós-descongelção com o meio lactose-gema contendo 5% de DF. Os resultados superiores obtidos por estes autores provavelmente se devem às diferenças na concentração do crioprotetor e do meio diluente utilizado que diferiu basicamente pela substituição do Tris pela lactose e pela presença do Equex STM Paste® em sua composição. Este detergente comercial atua sobre a motilidade e integridade da membrana pós-descongelção (Peña & Linde-Forsberg 2000), podendo ter sido também um dos fatores que favoreceram à maior porcentagem de membrana íntegra observada ($56,7 \pm 7,5\%$) em relação ao presente estudo.

Em geral, no presente trabalho, a MF apresentou resultados semelhantes quando comparada ao GL na criopreservação de sêmen canino no delineamento experimental aqui utilizado, enquanto que a DF mostrou-se inferior ao GL. Em eqüinos, tanto a MF como a DF têm conferido uma proteção aos danos causados pela criopreservação de forma tão efetiva, ou ainda superior, que o GL. Squires et al. (2004) demonstraram que a MF e a DF em diferentes concentrações na congelação de sêmen eqüino conferiram proteção aos espermatozóides de maneira semelhante ao GL. Neste mesmo trabalho, os autores sugerem que concentrações mais elevadas de MF (0,6 e 0,9M) foram mais efetivas na proteção aos danos causados pela criopreservação do que concentrações mais baixas (0,3M). Os valores obtidos com o tratamento MF a 3% do presente trabalho para motilidade total e progressiva são próximos daqueles obtidos com concentrações maiores de MF no sêmen eqüino (Squires et al. 2004). Além disso, a exemplo do que foi demonstrado para eqüinos (Squires et al. 2004), é possível que melhores resultados na criopreservação de sêmen canino possam ser alcançados ao se utilizar concentrações maiores de MF do que a que foi utilizada no presente estudo.

As diferenças observadas entre o presente trabalho e o conduzido por Squires et al. (2004) provavelmente se devem a variações na fluidez da membrana plasmática dos

espermatozóides eqüinos e caninos, o que confirma a hipótese de que a atuação dos agentes crioprotetores é espécie-específica (Holt 2000; Peña & Linde-Forsberg 2000; Rota et al. 2006). Foi identificada recentemente uma proteína de canais de água (*water channel protein*) denominada Aquaporina 7 (AQP7) cuja função primária é o transporte de GL (Curry 2000). A presença ou ausência da AQP7 na membrana plasmática pode explicar as diferenças de permeabilidade ao GL nas células espermáticas entre as diferentes espécies. Acredita-se que a falta da AQP7 esteja relacionada com a adequação das amidas na criopreservação do sêmen de coelhos, uma vez que o GL não é o crioprotetor de eleição nesta espécie (Okuda et al. 2007). Em cães, a APQ7 foi detectada no epitélio da região proximal do epidídimo e nos vasos deferentes (Domeniconi et al. 2008) mas sua presença na membrana espermática canina não foi reportada até o presente momento.

Durante o TTR, apesar da MF e da DF não terem apresentado diferença estatisticamente significativa no T0, nos outros tempos a MF apresentou melhores resultados que a DF, demonstrando uma melhor capacidade em manter a taxa de motilidade espermática ao longo do tempo. O objetivo do TTR é promover uma simulação parcial do processo *in vivo* visando avaliar a longevidade espermática que o sêmen teria no interior do trato reprodutor da fêmea (Rota et al. 1997). Entre o GL e a MF não foram observadas diferenças significativas, tanto imediatamente após a descongelação (T0), como durante todos os tempos avaliados no TTR, demonstrando assim uma capacidade crioprotetora da MF semelhante à do GL no protocolo aqui empregado. Entretanto, neste experimento, a DF mostrou-se menos eficiente que a MF e o GL na preservação da motilidade espermática durante o TRT.

Baseado nos resultados do HOST do presente estudo, o GL apresentou uma maior capacidade de manutenção da integridade de membrana que a MF e a DF, sendo que entre estas não houve diferença. A associação GL 3% + DF 2% no estudo feito por Chirinéa et al. (2006) produziu resultados semelhantes no HOST ($34,1 \pm 14,2\%$) aos observados para MF e DF no presente estudo ($35,8 \pm 18,7\%$ e $34,4 \pm 9,3\%$, respectivamente). A importância do HOST como ferramenta adicional às análises convencionais na avaliação da qualidade espermática (Jeyendran et al. 1984; Kumi-Diaka 1993; Kumi-Diaka & Badtram 1994; Rodríguez-Gil et al. 1994), e na avaliação de machos subfêrteis com espermogramas aparentemente normais (Kumi-Diaka 1993; Kumi-Diaka & Badtram 1994) parece ser um consenso entre diferentes autores. Entretanto, segundo Hauser et al. (1992), as características seminais envolvidas no processo de fertilização não são diretamente expressas através dos valores do HOST, dessa forma, a superioridade do GL no HOST não reflete, necessariamente, uma maior capacidade fecundante. Em contraste, Kumi-Diaka (1993) e Rodríguez-Gil et al.

(1994) afirmam haver uma alta correlação entre resultados positivos no HOST e a motilidade em cães, mas nenhum destes trabalhos correlacionaram estes resultados com a capacidade fecundante do espermatozóide congelado-descongelado seja *in vitro* ou *in vivo*. Apesar da correlação entre o HOST e a capacidade fecundante ter sido encontrada em outras espécies (humanos: Jeyendran et al. 1984; bovinos: Revell & Mrode 1994), Silva et al. (2006b) concluíram que a análise da integridade da membrana plasmática apresenta um pequeno valor preditivo na interação do espermatozóide congelado-descongelado com oócitos homólogos, e que a integridade da membrana plasmática estaria mais relacionada com o padrão de motilidade apresentado pelos espermatozoides.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Em conclusão, apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas entre a MF e a DF, também não foram observadas diferenças entre o GL e a MF. Dessa forma, nós sugerimos que a DF a 3% não é eficiente para a criopreservação do sêmen canino, enquanto que a MF mostrou-se promissora como um crioprotetor alternativo ao GL na congelação de sêmen canino.

Mais estudos são necessários para avaliar diferentes concentrações da MF e o seu uso em diferentes métodos de processamento. Além disso, a realização de testes de toxicidade das amidas pode ser útil para a adequação do protocolo de congelação a ser empregado, melhorando, assim, seus efeitos na criopreservação do sêmen canino. Propomos ainda que estudos futuros sejam conduzidos realizando análises morfológicas mais pormenorizadas do sêmen congelado-descongelado utilizando as amidas como agente crioprotetor, permitindo avaliar de forma qualitativa os danos causados por essas substâncias.

De acordo com a literatura, apesar da AQP7 já ter sido identificada no epitélio da região proximal do epidídimo e nos vasos deferentes, sua presença na membrana espermática canina não foi reportada até o presente momento. Dessa forma, um estudo mais detalhado da membrana do espermatozóide canino buscando detectar a presença da AQP7 pode abrir perspectivas de novos protocolos ou otimizar os atualmente empregados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 105–113, 2005.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F. et al. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 632–638, 2008.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHÔA, D.C. et al. Canine semen freezing using a egg yolk-glycerol-coconut water extender. **Ciência Animal**, v. 10, n. 1, p. 29-36, 2000.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M.. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 3-4, p. 384-391, 2006.

CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; MEDEIROS, A.S.L. et al. Improvement of stallion semen post-thaw motility with the association dimethyl formamide. **Animal Reproduction Science Abstracts**, v. 89, n. 1-4, p. 286, 2005.

CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P. et al. Cryoprotector action of the glycerol and ethylene glycol in the freezing of the dog semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 174–176, 2002.

CHALAH, T.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. et al. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 185-191, 1999.

CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.M.; SOUZA, F.F.S. et al. Morphofunctional characteristics of canine cooled and frozen semen using two different extenders. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 407–415, 2006.

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 46-52, 2000.

DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; JUSTULIN JR, L.A. et al. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. **Cell and Tissue Research**, v. 332, n. 2, p. 329–335, 2008.

DURRANT, B.S.; RAVIDA, N.; SPADY, T. et al. New technologies for the study of carnivore reproduction. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1729–1736, 2006.

ENGLAND, G.C.W; PLUMMER, J.M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 47, p. 261-70, 1993.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 375–387, 2000.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. In: FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W (Ed.) **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: Saunders, 2004. p.1005–1013.

GOBELLO, C.; CORRADA, Y. Biotechnology in canine reproduction: an update. **Analecta Veterinaria**, v. 23, n. 1, p. 30-37, 2003.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 277-299, 2002.

GOODROWE, K.L.; WALKER, K.L.; RYCKMAN, K.L.. et al. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 389–403, 2000.

HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, n. 1, p. 247-252, 1980.

HAUSER, R.; YAVETZ, H.; PAZ, G.F. et al. The predictive fertilization value of the hypoosmotic swelling test (HOST) for fresh and cryopreserved sperm. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 9, n. 3, p. 265-70, 1992.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47–58, 2000.

IVANOVA-KICHEVA, M.G.; BOBADOV, N.; SOMLEV, B.. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mℓ aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, v. 48, n. 8, p. 1343-1349, 1997.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-28, 1984.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Semen collection, evaluation, and preservation. In: JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. (Ed.) **Canine and feline theriogenology**. 1ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.287–306.

KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y. et al. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 4, p. 511–516, 2006.

KUMI-DIAKA, J.. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.

KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: In vitro bioassay for canine semen. **Theriogenology**, v. 41, n. 7, p. 1355-1366, 1994.

LUKASZEWICZ, E. An effective method for freezing White Italian gander semen. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 19-27, 2002.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. **Theriogenology**, v. 66 n. 9, p. 2047–2055, 2006.

MCNIVEN, M.A.; GALLANT, R.K.; RICHARDSON, G.F.. Dimethyl-acetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, n. 5, p. 943-948, 1993.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T. et al. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 273-276, 2002.

OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 47, p. 257–260, 1993.

OGIER DE BAULNY, B.; LABBE, C.; MAISSE, G.. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 177–184, 1999.

OKANO, T.; MURASE, T.; ASANO, M. et al. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 11, p. 1359-1364, 2004.

OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S. et al. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese White Rabbit. **Experimental Animals**, v. 56, n. 1, p. 29–34, 2007.

OLAR, T.T.; BOWEN, R.A.; PICKETT, B.W.. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v. 31, n. 2, p. 451-461, 1989.

OLIVEIRA, Érika Cristina Santos. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação de sêmen canino**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, 2003. 60p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, A. et al. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 163-174, 1998.
- PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C.. Effects of Equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 859-875, 2000.
- REVELL, S.G.; MRODE, R.A.. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, n. 1-2, p. 77-86, 1994.
- RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T.. Effects of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, n. 5, p. 815-829, 1994.
- ROHLOFF, D.; LAIBLIN, C.; HEIDRICH, S.. Cryoprotective ability of glycerin and DMSO in the deep freezing of dog sperm. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 91, n. 2, p. 31-33, 1978.
- ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J. et al. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, n. 5, p. 355-361, 1998.
- ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G. et al. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1848-1858, 2006.
- ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. et al. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1093 – 1101, 1997.
- SANTOS, S.E.C.; VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S. et al. Comparison of two cryoprotectants for freezing dog semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 472-473, 2001.
- SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E. et al. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 173-182, 2006.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.. Effect of the thawing on the viability of canine semen in vitro. **Ciência Animal**, 8, n. 2, p. 75-80, 1998.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.. Canine semen's freeze with different concentrations of egg yolk and glycerol in TRIS and coconut water extenders. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1021-1025, 2000.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.. Canine semen cryopreservation: review. **Ciência Animal**, v.11, n. 2, p. 119-129, 2001.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 1, p. 74–78, 2006a.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.S.C.; SILVA, L.D.M. et al. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm–oocyte interactions. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 456–462, 2006b.

SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P.. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 44, n. 4, p. 571-579, 1995.

SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A. et al.: Ethylene glycol on canine sêmen cryopreservation. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 649–655, 2002.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1056–1065, 2004.

STRÖM, B.; ROTA A.; LINDE-FORSBERG, C.. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology** v. 48, n. 2, p. 247-256, 1997.

TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS E.. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v. 78, n. 4, p. 586–90, 1999.

ZIMMERMANN, M.; SANTOS, T.E.; FIDELIS, A.A.G. et al. The use of dimethyl formamide and coconut water in canine semen cryopreservation. **Revista Bioscience Journal** 23, n. 1, p. 96–100, 2007.