



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
ÀREA DE CONCENTRAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO ANIMAL
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL
Campus da Socopo - 64.049-550 Teresina, Piauí - Fone: 3237-2069.**

SABRINA THABLA PEREIRA LOPES

EFICIÊNCIA DE DUAS TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES
EPIDIDIMÁRIOS DE CÃES E AVALIAÇÃO SEMINAL *IN VITRO* UTILIZANDO O
DILUIDOR TRIS-GEMA

TERESINA – PI

2018

SABRINA THABLA PEREIRA LOPES

EFICIÊNCIA DE DUAS TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO DE
ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CÃES E AVALIAÇÃO SEMINAL *IN*
VITRO UTILIZANDO O DILUIDOR TRIS-GEMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

TERESINA – PI

2018

L864e Lopes, Sabrina Thabla Pereira.
Eficiência de duas técnicas de recuperação de
espermatozoides epididimários de cães e avaliação seminal
in vitro utilizando o diluidor Tris-gema / Sabrina Thabla
Pereira Lopes. – 2018.
66 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade
Federal do Piauí, Teresina, 2018.

“Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza”.

1. Cães. 2. Espermatozoides. 3. Epidídimo. 4. Flutuação.
5. Fluxo Retrógrado. I. Título.

CDD 636.7

EFICIÊNCIA DE DUAS TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CÃES E AVALIAÇÃO SEMINAL
IN VITRO UTILIZANDO O DILUIDOR TRIS-GEMA

SABRINA THABLA PEREIRA LOPES

Dissertação aprovada em: 12/03/2018

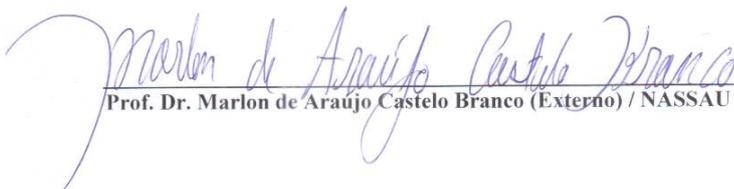
Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Luanna Soares de Melo Evangelista (Interna) / CCS/UFPI



Prof. Dr. Marlon de Araújo Castelo Branco (Externo) / NASSAU

DEDICATÓRIA

Ao maior amor que eu tenho nesse mundo Maria José Pereira Lopes, minha mãe, minha irmã querida Samara Tallita Perreira Lopes e aos meus filhos que tanto amo, Prince, Belinha, Maria Mel, Dimy, Sansão e ao meu eterno Louro que sempre e para sempre estará em meus pensamentos e coração!

AGRADECIMENTOS

“Eu sou a videira, vós as varas; quem está em mim, e eu nele, esse dá muito fruto; porque sem mim nada podeis fazer” (João 15. 5). Sem Deus absolutamente nada podemos fazer e é a ELE a quem eu agradeço primeiramente essa conquista.

Acredito que não foi em vão que o Senhor me fez trilhar todo esse caminho que tão difícil foi. Só eu e ELE sabemos. Muito obrigada meu DEUS por todas as vezes que pensei em desistir e em todas elas TU levantaste alguém para me dizer: “NÃO, NÃO DESISTA, TÁ ACABANDO”.

Agradeço ao meu amor maior minha mãezinha querida Maria José Pereira Lopes por me amar independente de qualquer coisa e por me guardar em oração para que Deus me proteja ao sair e ao chegar em casa, por me compreender e aconselhar nas tão poucas vezes que eu conseguia compartilhar as angústias as quais estava passando e por todo seu cuidado e amor. EU TE AMO MÃEZINHA!

Agradeço a minha irmã Samara Tallita Pereira Lopes por me suportar nesses dois anos, por me ajudar nas vezes que precisei de apoio e de ajuda muitas vezes financeira, para que conseguisse alcançar os objetivos desta pesquisa.

Obrigada ao meu príncipe Hiran Esmeraldo Albuquerque Beserra. EU TE AMO MUITO MEU AMOR. Obrigada por também me ajudar nesse tempo, por todo suporte emocional e financeiro. Muito obrigada por tudo amor!

Ao meu orientador Prof. Dr. Adalmir Torres de Souza, que me acolheu de muito bom grado, ensinando-me nos momentos que solicitei, puxou minhas orelhas quando mereci e que com seu pouco falar soube me guiar nessa tão importante jornada. Muito obrigada professor. Rogo a Deus que o cubra de suas mais infinitas bênçãos.

Obrigada a Profa. Luanna Soares de Melo Evangelista, que foi espetacular em tudo, por toda a paciência que teve comigo, mesmo com temperamentos tão parecidos você soube driblar isso tão perfeitamente. Obrigada por me acolher, por caminhar comigo ao meu ritmo mesmo quando você queria que eu a acompanhasse no seu, por segurar na minha mão e dizer que sempre ia dá certo, por falar: “Sabrina, pensa que tu tem que terminar isso, pensa só nisso” (rindo alto), pelos puxões de orelha, por sempre me mostrar a melhor alternativa. Obrigada de coração!

Obrigada Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho por absolutamente tudo, por ajudar-me nas coletas e processamento das amostras, por se “tacar” comigo daqui a

Fortaleza com a cara e coragem pra fazemos o CASA, por seu alto astral e por transformar o meu astral ruim em bom, nos dias que eu chegava desanimada, por ser esse poço de calma e por respeitar e compreender meus momentos de revolta. Obrigada pelas palavras força e coragem, pra continuar. Considero-te demais e conte comigo sempre pra o que eu puder ajudar. Muito obrigada “baixinho”.

Agradeço também a Profa. Dra. Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro por me introduzir no mundo da reprodução, pela realização também dos testes de brucelose e leptospirose das minhas amostras e por sempre se mostrar solícita quando lhe pedir auxílio.

Obrigada aos alunos do LBRA /UFPI pelos momentos de auxílio e alegrias compartilhados diariamente e que foram essenciais para tornar a caminhada mais leve.

Agradeço a minha amiga Jaqueline Rodrigues Lustosa Camapum pelas ouvidos emprestados nos momentos difíceis, por ser minha dupla sempre nas disciplinas, momentos de alegrias, tristezas vividas e conquistas alcançadas.

Obrigada dona Luciana Maia e Alexandre Chaves, pessoas a quem devo muita estima e gratidão. Vocês também fazem parte dessa história e conquista, obrigada por todo suporte e compreensão que me deram.

Obrigada aos meus poucos amigos que me acompanharam nessa árdua jornada. Ligiane Siqueira, Diego Vasconcelos e Renato Ricelli.

Agradeço também ao Hospital Veterinário Universitário e a todos os seus funcionários, residentes e Prof. Macêdo por me darem o suporte necessário para as coletas e realizações de exames, as clínicas veterinárias Pet Vitalle, Doctor Vet, Clínica Veterinária Animals e a Criar Centro Veterinário.

Agradeço ainda a Universidade Federal do Piauí- UFPI pela oportunidade da graduação em Medicina Veterinária, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da referida instituição pela oportunidade do cursar o mestrado, a Agência de fomento CAPES E CNPq pelo auxílio financeiro por meio da bolsa de estudos e a Universidade Estadual do Ceará (UECE) pela disponibilidade do uso das análises do CASA.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram comigo nessa caminhada e que ajudaram de alguma forma.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. ANATOMIA DO EPÍDIDIMO E SUAS FUNÇÕES	15
2.2. DESCRIÇÃO E AVALIAÇÃO DO SÊMEN CANINO	17
2.3. TÉCNICAS DE COLETA DE SÊMEN EM CÃES	19
2.3.1. Estímulo Manual	19
2.3.2. Recuperação de espermatozoides do epidídimo e ducto deferente	20
2.4. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO SÊMEN	22
2.4.1. Motilidade e Vigor Espermático	22
2.4.2. Concentração espermática	23
2.4.3. Morfologia espermática.....	23
2.5. DILUIDORES PARA SÊMEN CANINO	24
2.6. CRIOPRESERVAÇÃO.....	27
2.7. SONDAS FLUORESCENTES	28
2.7.1. Integridade da membrana plasmática	29
2.7.2. Integridade do Acrossoma.....	30
2.7.3. Potencial Mitocondrial	31
2.8. ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN (CASA).....	32
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO I.....	51
Eficiência de duas técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários de cães e avaliação seminal pós-criopreservação.....	51
RESUMO	52
ABSTRACT	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Motilidade e vigor espermáticos avaliadas nas técnicas de recuperação epididimária de cães após orquiectomia, sêmen fresco diluído e pós-criopreservado ($\bar{X} \pm \text{EMP}$)..... 51
- Tabela 2.** Motilidade e vigor espermáticos avaliados por meio do Teste de Termorressistência Rápida do sêmen de cães orquiectomizados pós-criopreservação ($\bar{X} \pm \text{EMP}$)..... 54
- Tabela 3.** Integridade do acrossoma e membrana plasmática do sêmen de cães orquiectomizados pós-criopreservação por meio do teste de sondas fluorescentes, tempos T0 a T90 ($\bar{X} \pm \text{EMP}$) 54
- Tabela 4.** Cinética de espermatozoides descongelados de cães orquiectomizados avaliados pelo teste do CASA ($\bar{X} \pm \text{EMP}$) 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: Porcentagem

<: Menor

>: Maior

±: Mais ou menos

°C : Graus Celsius

µm : Micrômetros

ACP-106® : Diluente à base de água de coco em pó formulado para a conservação de sêmen da espécie canina

DP: Desvio padrão

□: Média

mL: Mililitros

µL: Microlitros

mm³: milímetros cúbicos

pH: Potencial de hidrogênio

TRIS: Tris-hidroximetil-aminometano

Ca²⁺ : íon cálcio

UFC/ml: Unidades Formadoras de Colônia por mililitros

α: alfa

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

µm/s: micrômetros por segundo

Hz: Hertz

T0: tempo zero

T30: tempo 30 minutos

T60: tempo 60 minutos

T90: tempo 90 minutos

NaCl: Cloreto de sódio

mg/mL: miligramas por mililitro

DMSO: Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

µm/s: micrômetros por segundo

µg/mL: microgramas por mililitros

PBS: phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)

RESUMO

A coleta de espermatozoides epididimários é utilizada, experimentalmente, em diversas espécies animais, sendo um recurso importante em casos de animais de alto valor genético ou de grande estima. O presente trabalho objetivou avaliar a taxa de recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo de cães, utilizando as técnicas de flutuação (FL) e fluxo retrógrado (FR), após a orquiectomia, avaliando a qualidade destes espermatozoides em meio diluidor Tris-gema, a fresco e após a criopreservação. Foram utilizados 30 complexos testículo-epidídimos (CTE). O material coletado foi levado para o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - UFPI para a realização das técnicas citadas. Em cada técnica foram testadas quinze amostras de CTE diluídos em Tris-gema. Posteriormente, foram avaliadas as características seminais de motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática, além do teste de termorresistência rápida (TTR) nos tempos T0, T30, T60 e T90 minutos após a criopreservação. Foi avaliada a integridade da membrana espermática e do acrossoma com o uso de sondas fluorescentes. Também foi realizada a análise computadorizada do sêmen (CASA). Para a estatística dos dados foram obtidas as médias e desvio-padrão das taxas de recuperação dos espermatozoides epididimários, utilizando a Análise de Variância, através do Programa Statistical Analysis System for Windows (SAS), empregando o teste de Duncan no caso de diferenças significativas entre os grupos testados, sendo considerados significativos quando $P < 0,05$. Dos resultados analisados observou-se que não houve diferença significativa entre os métodos de flutuação e fluxo retrógrado no sêmen fresco e pós-criopreservado em relação aos parâmetros de motilidade e vigor. No TTR a partir do T30 houve influência negativa nestes parâmetros em ambas as técnicas. Para a integridade do acrossoma, o tempo afetou a integridade destas células, também a partir do T30. Já na porcentagem de células com membrana plasmática íntegra do sêmen pós-criopreservado, o tempo não interferiu nas técnicas testadas, mesmo decorridos 90 minutos pós-criopreservação. Com relação à análise do CASA houve diferença estatística no parâmetro seminal de motilidade progressiva entre as técnicas analisadas. Diante do presente experimento conclui-se que as técnicas de recuperação espermática epididimária podem ser utilizadas para a criopreservação de sêmen de cães recentemente castrados, porém mais estudos devem ser realizados para confirmação destes e de novos resultados.

Palavras – chave: cães, espermatozoides, epidídimo, flutuação, fluxo retrógrado.

ABSTRACT

The collection of epididymal spermatozoa is experimentally used in several animal species, being an important resource in cases of animals of high genetic value or high esteem. The objective of this study was to evaluate the recovery rate of spermatozoa from the tail of the epididymis of dogs, using flotation (FL) and retrograde flow (RF) techniques after orchietomy, evaluating the quality of these spermatozoa in dilution medium Tris-gem, fresh and after cryopreservation. 30 testis-epididymal complexes (CTE) were used. The collected material was taken to the Reproduction Biotechnology Laboratory - UFPI to perform the mentioned techniques. Fifteen CTE samples diluted in Tris-gem were tested in each technique. Subsequently, the semen characteristics of motile, vigor, concentration and sperm morphology were evaluated, as well as the rapid thermoresistance test (TTR) at T0, T30, T60 and T90 minutes after cryopreservation. The integrity of the spermatid membrane and the acrosome was evaluated with the use of fluorescent probes. A computerized semen analysis (CASA) was also performed. For statistical data, mean and standard deviation of the epididymal sperm recovery rates were obtained using the Statistical Analysis System for Windows (SAS), using the Duncan test in the case of significant differences between the groups tested, being considered significant when $P < 0.05$. From the analyzed results it was observed that there was no significant difference between the flotation and retrograde flow methods in fresh and post cryopreserved semen in relation to the parameters of motility and vigor. In TTR from T30 there was a negative influence on these parameters in both techniques. For the integrity of the acrosome, the time affected the integrity of these cells, also from the T30. In the percentage of cells with full plasma membrane of post-cryopreserved semen, the time did not interfere in the techniques tested, even after 90 minutes post cryopreservation. Regarding the analysis of CASA, there was a statistical difference in the seminal parameter of progressive motility between the techniques analyzed. In the present experiment it is concluded that epididymal sperm retrieval techniques can be used for the cryopreservation of semen from recently castrated dogs, but further studies should be performed to confirm these and new results

Key words: dogs, spermatozoa, epididymis, fluctuation, retrograde flow.

1. INTRODUÇÃO

A coleta de espermatozoides epididimários é utilizada, experimentalmente, em diversas espécies animais (Granemann et al., 2006; Freire et al., 2012; Mota Filho et al., 2012), sendo um recurso importante em casos de animais de alto valor genético ou de grande estima, que precisam ser esterilizados ou que vêm a óbito. A técnica possibilita, dentro de um determinado período de tempo, a recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo do animal e pode ser uma oportunidade para assegurar a preservação do material genético (Freire et al., 2012; Mota Filho; Silva, 2012), já que esses gametas, assim que recolhidos, são capazes de resistir à refrigeração, até serem, posteriormente, criopreservados (Martins et al., 2007).

A obtenção de espermatozóides epididimários é basicamente por duas técnicas: flutuação e fluxo retrógrado. A primeira consiste em fatiar a cauda do epidídimo e deixá-lo em um meio diluidor para que os espermatozoides migrem para o meio (Yu; Leibo, 2002). A outra promove um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo aplicando-se pressão aos vasos deferentes até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo (Garde et al., 1994).

Na técnica de flutuação, o complexo testículo-epidídimo é lavado e dissecado até o isolamento completo da cauda do epidídimo e do ducto deferente, estes são posicionados sobre uma placa de Petri com um diluidor aquecido a 38°C, em seguida, o fatiamento do epidídimo é realizado e a solução obtida é recuperada e avaliada (Freire et al., 2012). Já a técnica de fluxo retrógrado é a mais indicada, pois as amostras obtidas apresentam um menor nível de contaminação e são de melhor qualidade em relação aos outros métodos (Martinez-Pastor et al., 2006). Porém, trabalhos mostraram que para a espécie canina, a técnica de flutuação parece ser mais eficiente, independentemente do diluidor utilizado (Mota Filho et al., 2012).

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a taxa de recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo de cães, após a orquiectomia, utilizando as técnicas de flutuação e fluxo retrógrado, bem como avaliar a viabilidade destes espermatozoides em meio diluidor tris-gema, podendo assim, oferecer mais uma ferramenta de biotecnologia aplicada à espécie canina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ANATOMIA DO EPÍDIDIMO E SUAS FUNÇÕES

O epidídimo, do Grego *epi* (dentro) e *didymoi* (germinativo ou testículo), é um órgão alongado, localizado na superfície do testículo, monotubular, enrolado em espiral, que transporta os espermatozoides dos vasos eferentes para os vasos deferentes (Sullivan et al., 2005). Dependendo da espécie, o comprimento do ducto epididimário pode variar de 3-4 metros. Morfologicamente, o epidídimo é geralmente dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda (Oliva et al., 2009). A cabeça do epidídimo encontra-se firmemente anexada ao testículo, local de confluência dos ductos eferentes ao ducto do epidídimo. Este último prossegue pelo corpo epididimário em posição medial-longitudinal ao testículo. A cauda do epidídimo é o local de estocagem das células até o momento da ejaculação, pois o ducto epididimário irá se unir ao ducto deferente (Chandler: Sinowatz; Pierrepoint, 1981).

O comprimento do ducto do epidídimo pode variar de acordo com a espécie, sendo, nos cães, de aproximadamente 5 a 8 metros (Schimming; Vicentini, 2001) e tem importância primordial de transportar os espermatozoides, sendo imprescindível para a maturação espermática (Belleanne; Thimon; Sullivan, 2012).

Nos mamíferos, o epidídimo possui diversas funções, como principalmente a reabsorção dos fluidos oriundos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração e o transporte espermáticos, a eliminação dos espermatozoides defeituosos, bem como a maturação e o armazenamento dos normais, esta última função é demonstrada pelo fato dos espermatozoides ejaculados sobreviverem por cerca de 24 horas fora do epidídimo em meio diluidor; enquanto que os que são mantidos na cauda do epidídimo (*in vivo*) permanecem com boa viabilidade por mais de 15 dias. Durante o armazenamento, o epidídimo acumula espermatozoides que podem ou não ser utilizados na cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozoides do macho (Muradas et al., 2006; Mota Filho, 2014).

O espermatozoide liberado pelo testículo ao alcançar o epidídimo ainda não possui habilidade de se movimentar, de reconhecer e fecundar o ovócito, necessitando submeter-se a transformações ao longo do epidídimo para potencializar a função de formar o zigoto. O epidídimo, anatomicamente pode ser dividido em três segmentos: iniciando com a cabeça, onde o espermatozoide adquire motilidade progressiva; corpo que o habilita a

fecundar; e cauda, local de armazenamento. Vale ressaltar ainda, que as células epididimais são especializadas não só em criar o ambiente para amadurecer o espermatozoide, mas também para realizar a proteção imunológica (Shivaji, 1988; Sullivan et al., 2005).

Durante o trânsito pelas regiões da cabeça, corpo e cauda dos epidídimos, os espermatozoides sofrem importantes modificações morfofuncionais, as quais permitem adquirir motilidade progressiva, por alterações mitocondriais, migrar a gota citoplasmática da região proximal para distal da peça intermediária e estabilizar a membrana plasmática e acrossomal (Amann; Hammerstedt; Veeramachaneni, 1993; Fouchecourt, 2000; Jervis; Robaire, 2001).

A maturação espermática é a função mais estudada do epidídimo. Trabalhos demonstram que espermatozoides coletados da cabeça do epidídimo são incapazes de fertilização quando usados para inseminação artificial ou fertilização *in vitro*. Na maioria das espécies, os espermatozoides tem que alcançar a porção final do corpo do epidídimo para adquirir potencial de fertilização. A aquisição da habilidade de fertilização durante o transito epididimal define o conceito de maturação espermática (Horan e Bedford, 1972; Mota Filho, 2014).

O processo de maturação dos espermatozoides depende de uma sequencia de modificações espermáticas resultantes da interação de proteínas e secreções epididimais na superfície dos espermatozoides. Isto resulta numa mistura complexa de proteínas epididimais interagindo com o espermatozoide no lúmen do epidídimo (Mota Filho, 2014).

O processo de liberação das espermátides no lúmen do túbulo seminífero é chamado de espermição. Aproximadamente 9 dias são necessários para o transporte dos espermatozoides através do sistema de ductos, conseqüentemente, uma população nova de espermatozoides pode ser ejaculada apos 64-66 dias. Um ejaculado e, conseqüentemente, um composto dos eventos que ocorreram nos dois meses anteriores que influenciaram a espermatogênese quando os espermatozoides estavam sendo formados, e subseqüentemente o seu transporte e maturação através do sistema de ductos (Amann, 1993; Love, 2002).

2.2. DESCRIÇÃO E AVALIAÇÃO DO SÊMEN CANINO

Sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozoides (gametas masculinos) e secreções prostáticas. A porção fluida dessa suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal (Hafez; Hafez, 2004).

As secreções produzidas pelos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias constituem o plasma seminal (Mann; Mann, 1981; Rego et al., 2014). A próstata é a única glândula sexual acessória de cães, e seu fluido constitui aproximadamente 95% do ejaculado (Iguer-Ouada; Verstegen, 2001). É possível que o fluido da próstata tenha uma relação única com os espermatozoides em cães e os afeta de maneira diferente do que em outras espécies (Aquino-Cortez et al., 2016).

Várias proteínas foram identificadas no plasma seminal canino, e estudos tentaram mostrar como essas macromoléculas podem afetar a qualidade e a fertilidade do espermatozoide (Kikuchi et al., 2003; Souza et al., 2007; Saengsoi et al., 2011; Mogielnicka-Brzozowska et al., 2012).

A percentagem de spz morfolologicamente normais no sêmen de cão é considerada aceitável a partir de 70%. O espermatozoide normal é constituído por um acrossoma, cabeça, pescoço, peça intermédia e cauda. O acrossoma é uma estrutura de espessura uniforme, que cobre ligeiramente mais que a metade anterior da cabeça do espermatozoide. A peça intermédia tem aproximadamente o comprimento correspondente ao de uma cabeça e meia (Feldman; Nelson, 2004). Um espermatozoide canino normal, de qualquer raça, tem um comprimento total de 6,8 μm , uma peça intermédia de 1,1 μm e uma cauda com comprimento de 5,0 μm , dividida na sua parte principal e porção final. Todo o espermatozoide direito ou ligeiramente curvo, que não apresente defeitos evidentes na cabeça, peça intermédia ou cauda, é considerado normal (Johnston et al., 2001).

A percentagem de espermatozoide morfolologicamente normais em cães está positivamente correlacionada com a taxa de fertilidade. Neste estudo, o valor mínimo aceitável para a percentagem dos espermatozoides morfolologicamente normais foi de 60%. Segundo o autor, cães com um valor igual ou superior a este teriam uma taxa de concepção de 61%, enquanto os cães com uma percentagem de espermatozoides morfolologicamente normais inferior a 60% teriam uma taxa de concepção de apenas 13% (Oettle, 1993).

O cão ejacula em três frações, sendo que somente a segunda fração é rica em espermatozoides. A primeira fração ou fração pré-espermática parece estar relacionada com a limpeza no canal uretral e estabilização do pH para a passagem da segunda fração, tendo origem prostática (Johnston et al., 2001). A segunda fração, ou espermática, tem origem testicular, é rica em espermatozoides, com volume variando de 0,5mL a 4mL, conforme a variação individual e o tamanho testicular, possuindo um aspecto turvo, leitoso ou opalescente (Christiansen, 1988; Johnston et al., 2001; Silva, 2005). A terceira fração ou pós-espermática é o fluido prostático, fácil de distinguir da fração espermática pelo seu aspecto translúcido e cristalino, e com grande volume, origina-se da próstata e sua função é fornecer um meio diluidor natural, proporcionando o transporte das células espermáticas pelo trato reprodutivo da fêmea (Freshman, 2002; Silva et al., 2002; Feldman; Nelson, 2004).

A análise do sêmen deve estar incluída na avaliação andrológica para que sejam detectados problemas de infertilidade e subfertilidade (Feldman; Nelson, 1996). A análise padrão da amostra espermática do ejaculado do cão vem sendo realizada rotineiramente para avaliação da qualidade seminal (Silva et al., 2003). As variações observadas na espécie canina, quanto ao peso e ao volume, entre as diferentes raças, faz com que os ejaculados dos cães apresentem oscilações significativas de volume e de concentração espermática (Cunha, 1997).

As frequências recomendadas para as coletas de sêmen são: a cada 48 horas, uma coleta ao dia durante três dias consecutivos com 3 dias de repouso e duas coletas em um dia e 2 dias de repouso (Feldman; Nelson, 1996).

Antes da coleta do sêmen se procede o exame andrológico completo, constituído por histórico clínico e reprodutivo, exame físico, colheita e avaliação do sêmen, além de recursos diagnósticos como a ultrassonografia de testículos, próstata e epidídimo (England; Ponzio, 1996), é extremamente importante na avaliação do potencial reprodutivo do animal (Johnston, 1991).

A avaliação macroscópica do sêmen inclui algumas observações como volume, coloração e viscosidade (Silva et al., 2002). Sendo que o volume do ejaculado pode variar com o tamanho do animal, raça, clima e frequência das coletas. A cor do ejaculado, normalmente, é branca opalescente, porém, assim como a viscosidade da

amostra, esta coloração está diretamente relacionada com a concentração espermática (Cunha, 2005).

A avaliação microscópica do sêmen deve incluir a porcentagem de células móveis (motilidade) e qualidade desta motilidade conhecida como vigor, concentração espermática e morfologia espermática, (Silva et al., 2002).

Os movimentos dos espermatozoides não obedecem a um padrão único, pois há deslocamentos das células para frente (movimento progressivo), em circunferência (movimento circular) ou, ainda, podem apenas se limitar a oscilar no campo microscópico (movimento oscilatório ou local) (Salviano; Souza, 2008).

Para a análise da morfologia espermática realiza-se a confecção de um esfregaço da amostra e, em seguida, a coloração, podendo-se utilizar diversos corantes. Uma metodologia empregada é o vermelho congo e o cristal de violeta. A leitura da lâmina é feita em microscópio em campo claro com aumento de 1000 vezes. Duzentos espermatozoides devem ser contados em cada esfregaço (Silva et al., 2002; Cunha, 2005; CBRA, 2013).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal classifica as patologias espermáticas em maiores e menores. As patologias espermáticas podem ser também classificadas em: primárias, que são aquelas patologias advindas da espermatogênese, e secundárias, que são aquelas causadas durante o trajeto pelas vias seminais superiores ou pela manipulação da amostra seminal (Feldman; Nelson, 1996; CBRA, 2013). A avaliação da morfologia espermática é o exame que apresenta maior correlação com o índice de fertilidade. Cães com 60% de espermatozoides normais demonstraram uma taxa de fertilidade de 61% (Oettlé, 1993). Os defeitos maiores não podem ultrapassar 10% do total de espermatozoides da amostra e os defeitos menores devem ser menores que 30% (CBRA, 2013).

2.3. TÉCNICAS DE COLETA DE SÊMEN EM CÃES

2.3.1. Estímulo Manual

O estímulo manual é o método de coleta de sêmen mais utilizado para cães domésticos, sendo o método mais confiável, mesmo para cães não condicionados (Silva et al., 2003). O sêmen é colhido por estimulação manual do pênis e prepúcio, na altura do

bulbo peniano com o animal em estação até que o animal atinja a ereção parcial (Vannucchi et al., 1998; Feldman; Nelson, 2004).

O prepúcio deve ser então, retraído para trás do bulbo e o manipulador deve exercer uma pequena pressão no pênis na região posterior ao bulbo. Os movimentos pélvicos serão coincidentes com a fração pré-espermática. Em seguida, o cão se torna imóvel e é ejaculada a fração espermática. O cão, então, tenta girar a perna durante a ejaculação da terceira fração. O material coletado deve ser mantido a 38°C (Seager; Platz, 1977; Feldman; Nelson, 1996). O ejaculado é colhido em frações, com auxílio de um funil de vidro ou de plástico, acoplado em tubo cônico graduado, pré-aquecido e protegido da luz, devendo-se evitar contato direto entre o pênis e o material da colheita, (Seager; Platz, 1977; Christiansen, 1988; Michael et al., 2008; Baptista Sobrinho et al., 2009).

O ambiente para a realização da coleta deve ser calmo, confortável para o animal, sem muitas pessoas, sem barulho e com um piso adequado. No momento da coleta, podem-se utilizar fêmea no cio ou swab de fêmea no cio para facilitar a excitação e melhorar a qualidade do sêmen coletado (Feldman; Nelson, 1996).

2.3.2. Recuperação de espermatozoides do epidídimo e ducto deferente

O epidídimo é um componente do trato reprodutivo dos machos e está inserido na superfície dorsolateral do testículo. Macroscopicamente distinguem-se três regiões, denominadas regiões de cabeça, corpo e cauda epididimárias. O processo de maturação espermática, responsável pela produção de espermatozoides viáveis capazes de fertilizar os oócitos nas fêmeas, ocorre durante a passagem do gameta pelo epidídimo (Hafez; Hafez, 2004).

A recuperação de espermatozoides maduros e viáveis da cauda do epidídimo e ducto deferente de amostras *post mortem* e de animais incapazes de ejacular é possível e representa uma ferramenta importante para a preservação de gameta. Consiste em uma técnica importante para a obtenção de reservas de gametas de animais geneticamente valiosos ou de machos de espécies ameaçadas de extinção, constituindo-se em uma biotecnologia promissora para a reprodução dessas espécies. Uma vez recuperados, os espermatozoides epididimários, faz-se necessário observar sua viabilidade, para posterior conservação (Howard, 1999; Silva et al., 2004; Mota Filho; Silva, 2012).

A técnica de lavagem foi descrita por Marks et al. (1994), os quais, com o auxílio de seringa e agulha, realizaram a lavagem dos epidídimos caninos com solução salina morna ou diluente para criopreservação e aspiração do conteúdo tanto da cauda do epidídimo como dos ductos deferentes. Segundo os referidos autores, trata-se do melhor método de recuperação de espermatozoides epididimários, pois um maior número de células espermáticas é obtido quando comparado à aspiração direta dos espermatozoides, que consiste em coletar o material também com o auxílio de seringa e agulha diretamente da cauda do epidídimo (Wildt, 1996; Bartels et al., 1999).

Nos animais de companhia, devido a morfologia do epidídimo, que consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo e deixar repousar em um meio diluidor, desta maneira, os espermatozoides migram para o meio e são recuperados através de filtração (Kawakami et al., 1993; Yu; Leibo, 2002). Esta técnica também é usada para obter amostras de espermatozoides dos animais de produção (Hishinuma et al., 2003).

Outro método que pode ser utilizado é o de fluxo retrógrado na cauda do epidídimo, que consiste em aplicar pressão aos vasos deferentes até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo (Garde et al., 1994; Kaabi et al., 2003). A pressão é gerada com uma seringa, que injeta ar ou algum diluente inócuo aos espermatozoides (Lambrechts et al., 1999). A colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo através desta técnica é a mais indicada, pois as amostras obtidas apresentam um menor nível de contaminação e são de melhor qualidade em relação aos outros métodos. Por outro lado, essa técnica possui a limitação de ser usada comumente para animais de produção devido ao tamanho do epidídimo e de ser mais complexa que as outras técnicas (Martinez-Pastor et al., 2006).

Uma técnica alternativa é a maceração da região da cauda do epidídimo e a obtenção de fluído luminal liberado pelo procedimento (Howard, 1999). Visando minimizar processos de autólise, após a morte do animal, o material deve ser rapidamente refrigerado a 5°C (Wildt, 1996; Howard, 1999). Em certos casos, esse material pode ser mantido no gelo e, posteriormente, ser refrigerado, desde que ele não entre em contato direto com o gelo. A motilidade inicial dessas células obtidas do epidídimo é frequentemente baixa, sendo necessária a diluição em meio de cultura para tecidos ou meios extensores e incubação a 21°C a 37°C por 10 minutos (Wildt, 1996).

Em cães domésticos, utilizando-se material de orquiectomia mantido refrigerado, observou-se que os espermatozoides do epidídimo mantidos a 4°C, por 8 dias, conservaram a sua motilidade, morfologia e habilidade de se ligarem a oócitos (Yu; Leibo, 2002). Para cães foi sugerido que na coleta de sêmen do epidídimo fosse previamente feito, uma lavagem da região da cauda epididimária, através da injeção de soro fetal bovino, TCM (meio de cultura para tecidos) 199 ou Tris no vaso deferente visando uma melhor qualidade do material a ser obtido (Sirivaidyapong, 2002).

2.4. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO SÊMEN

2.4.1. Motilidade e Vigor Espermático

A motilidade espermática é definida como sendo a porcentagem de espermatozoides móveis. Atualmente a maioria dos pesquisadores ainda utiliza a motilidade como principal parâmetro para a avaliação da qualidade seminal (Madeira, 2007). A taxa de gestação em cadelas inseminadas com sêmen congelado estaria relacionada principalmente com o número de espermatozoides móveis após a descongelação, contudo o sêmen que apresenta uma boa motilidade após a congelação pode apresentar espermatozoides incapazes de realizar a fecundação em função de danos acrossomais. Além da qualidade seminal, a detecção do momento ideal para a realização da inseminação é de fundamental importância para o sucesso da inseminação artificial com o uso de sêmen congelado-descongelado (Pursel et al., 1972; Nothling et al., 1997).

O vigor é um parâmetro definido como sendo a velocidade de progressão do espermatozoide onde é atribuído uma nota que varia de 1 a 5 (CBRA, 2015). A presença de vigor 0 indica que o espermatozoide está imóvel, e o vigor 5 indica que o espermatozoide apresenta um movimento flechante e retilíneo. Cães normais devem apresentar vigor espermático superior a três (progressão moderada pra frente) (Dobrinsky et al., 1993; CBRA, 2013).

Para avaliação da motilidade e do vigor, uma gota de sêmen é colocada sobre uma lâmina e recoberta por uma lamínula e o material deve estar entre 37°C a 40°C. A avaliação é feita utilizando-se um microscópio de contraste de fase, no aumento de 100 ou 400 vezes. O resultado da motilidade é expresso em porcentagem, que varia de 0-100% (Cardoso et al., 2005). Para o vigor, uma escala que vai de 0 a 5, onde 0 seria as amostras

onde todos os espermatozoides estariam imóveis e 5 aquelas amostras em que o movimento demonstra-se rápido, com uma contínua progressão (Concannon; Battista, 1989; Santos; Vannucchi, 1997; Cunha, 2005; CBRA, 2013).

Uma amostra de sêmen normal deve possuir motilidade superior a 70% e, no caso do sêmen congelado-descongelado, no entanto, para a espécie canina, uma motilidade acima de 50% seria a ideal e, acima de 30% seria aceitável para se proceder uma inseminação artificial (Concannon; Battista, 1989).

2.4.2. Concentração espermática

Para avaliação da concentração espermática, utiliza-se, rotineiramente, o princípio de contagem celular através da câmara de “Neubauer”, e a diluição feita é 1:100 em formolsalina, e o número de espermatozoides é expresso em mm^3 . A concentração espermática considerada normal para cães de até 20 kg de peso corpóreo é de 50 – 200 x $10^6/\text{ml}$ de ejaculado (CBRA, 2013).

2.4.3. Morfologia espermática

Um parâmetro de fundamental importância para avaliação da qualidade espermática é a análise da morfologia das células, uma vez que, espermatozoides com alterações morfológicas comprometem de forma significativa a fertilidade de machos tanto da espécie canina como de outras espécies animais (Oettlé, 1993). Na morfologia se analisa as alterações estruturais dos espermatozoides, este quando com sua morfologia normal, é altamente especializado a cumprir com seu objetivo, fecundar o óvulo (Hafez; Hafez, 2004).

Alguns estudos correlacionam porcentagem de defeitos espermáticos e infertilidade no cão sendo reconhecido que 70% ou mais dos espermatozoides no ejaculado devem ser livres de alterações estruturais (CBRA, 2013). Na espécie canina, à medida que se aumenta o percentual de espermatozoides anormais, a fertilidade é reduzida, sendo observado que, quando a proporção de espermatozoides morfológicamente normais estava abaixo de 60%, a fertilidade foi adversamente afetada (Oettlé, 1993).

As alterações morfológicas localizam-se com maior frequência na cabeça e na cauda do espermatozoide e podem ser classificadas como primárias, quando as alterações são oriundas de problemas na espermatogênese, ou secundárias, quando se originam durante o processo de maturação espermática, ou no decorrer dos problemas de manipulação do sêmen. Para a avaliação da morfologia, faz-se um esfregaço do sêmen, podendo ser empregados diversos corantes, sendo mais comum o uso da eosina e a nigrosina (Johnston et al., 2001; Gonsalves; Figueiredo, 2003).

As alterações morfológicas primárias são aquelas relacionadas com problemas oriundos da espermatogênese e as secundárias estão relacionadas a problemas oriundos da maturação espermática no epidídimo ou durante as fases de manipulação do sêmen, como colheita, diluição, resfriamento, congelamento, descongelamento ou ainda após febre, trauma, processo infeccioso e administração de glicocorticoides (Seager, 1986).

O outro método de análise das alterações morfológicas classifica os espermatozoides como apresentando defeitos maiores ou menores. Os defeitos maiores são aqueles que comprometem gravemente a fertilidade, enquanto que os menores são considerados defeitos de menor gravidade. Tanto um método quanto o outro podem analisar as alterações de acordo com a sua localização, ou seja, cabeça, peça intermediária e cauda (Seager, 1986; Oettlé; Soley, 1988; Oettlé, 1993; CBRA, 2013).

Para a visualização da morfologia espermática existem vários métodos disponíveis. Um deles é a realização de esfregaços de sêmen fixados com glutaraldeído ou tampão salina formolizada para manter as características celulares e permitir uma observação futura sendo então examinados por microscopia de contraste de fase, após o uso de corantes Wright, Rosa de Bengala, Diff-Quik, Spermac, Giemsa, Hematoxilina-eosina e eosina-nigrosina (Oettlé; Soley, 1985; Purswell et al., 1992; Ström et al., 1997; Peña, 2000; Cardoso et al., 2003; Silva et al., 2003; CBRA, 2013).

2.5. DILUIDORES PARA SÊMEN CANINO

O uso de diluidores na conservação do sêmen é imprescindível não só para tamponar as alterações do pH, que possam ocorrer ao longo do tempo, como são um substrato de energia para os espermatozoides e previnem que nestes ocorram alterações

durante a refrigeração, congelação e descongelação. Podem ainda ser adicionados agentes bacteriostáticos (Shahiduzzaman; Linde-Forsberg, 2007; Verstegen et al., 2005).

A composição do meio diluidor é de vital importância para criopreservação do sêmen e deve ser ajustada para cada espécie (Barbosa, 2007). O meio diluidor de sêmen deve apresentar: tampões que impeçam as mudanças nocivas de pH; uma fonte de lipoproteína ou material de alto peso molecular para prevenir o choque térmico (como a gema de ovo, leite ou lecitina de soja) durante o resfriamento; um substrato fonte de energia (glicose ou frutose); prevenção no crescimento de bactérias; pressão osmótica fisiológica e concentração de eletrólitos adequada; crioprotetores para reduzir os danos da congelação e outros aditivos como enzimas e antibióticos (Concannon; Battista, 1989; Aires et al., 2003; Forouzanfar et al., 2010).

Diferentes meios diluidores têm sido testados e utilizados, como os diluidores à base de glicina- gema, leite desnatado, tampão tris, diluidor à base de água de coco, diluidor à base de água de coco na forma de pó e lecitina de soja (Oliveira, 2003; Cardoso, 2005; Dalmazzo, 2012).

A água proveniente do fruto do coqueiro *Cocos nucifera L.* (membro da família Palmae) é uma solução estéril, ligeiramente ácida, rica em proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento (fitormônios) e pobre em fosfolípídeo (Laguna, 1996).

A água de coco contém ainda outros compostos que mostram atividades semelhantes às das citocininas e que são derivados das purinas (difetiluréia), sendo a auxina principal o ácido 3- indol-acético, o qual possui atividades biológicas consideradas excelentes para as células (Nunes; Salgueiro, 1999). Depois de várias pesquisas, foi isolada essa substância na água de coco, verificando que a mesma apresentava uma ação benéfica sobre a motilidade do sêmen de caprinos e ovinos incubado a 37°C (Nunes; Combarous, 1995).

Devido aos bons resultados obtidos com os primeiros estudos com a água de coco *in natura* na conservação, principalmente, de células espermáticas elaborou-se um meio de conservação à base de água de coco na forma de pó, o qual foi registrado como ACP® (ACP Biotecnologia®, Fortaleza - Ceará, Brasil) sendo utilizada como diluidor e obtiveram bons resultados na refrigeração do sêmen de equinos, diluição para inseminação artificial em caprinos, e em cães para resfriamento, inseminação artificial

com sêmen a fresco e refrigerado e criopreservação do sêmen (Salgueiro et al., 2002; Sampaio-Neto et al., 2002; Madeira et al., 2004; Uchoa et al., 2004; Cardoso et al., 2005; Nunes et al., 2005; Uchoa et al., 2007).

Os meios diluidores à base de leite desnatado-glicose ou glicina-gema de ovo são viáveis na utilização do processo de refrigeração de sêmen na espécie canina até o período de 72 horas. Os meios à base de leite desnatado-glicose e glicina-gema de ovo apresentaram resultados equivalentes no processo de refrigeração de sêmen na espécie canina, até o período de 72 horas (Cunha; Lopes, 2000).

Outros diluidores citados anteriormente como o leite desnatado já demonstraram claramente que um extensor simples e eficaz composto de leite desnatado, glicose e glicerol está disponível para a criopreservação de espermatozoides caninos como uma alternativa para extensores contendo gema de ovo, e isso pode contribuir para a troca eficiente de materiais genéticos e produção de cães-guia para cegos (Abe et al., 2008)

A gema de ovo tem sido o componente mais utilizado em diluidores de sêmen canino, com o objetivo principal de proteger os espermatozoides do choque causado pela criopreservação e perturbações durante o processo de congelamento e descongelamento (ABE et al., 2008). Estudos indicam que a gema de ovo estabiliza a membrana do espermatozoide através de uma interação com as proteínas do plasma seminal, dificultando o efluxo excessivo de fosfolipídios, mantendo a pressão coloidal e prevenindo a perda excessiva de cátions, regulando o fluxo de Ca^{2+} , além da possibilidade de impedir a capacitação prematura causada pelo choque frio (Kmenta et al., 2011) e reduzir os efeitos tóxicos do plasma seminal, fornecendo substratos para neutralizar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pelo sêmen durante o seu metabolismo (Papa et al., 2011).

A lecitina de soja possui uma fração de lipoproteína de baixa densidade, assim como a da gema de ovo, com a função de proteger a integridade da membrana fosfolipídica durante a criopreservação (Forouzanfar et al., 2010), e, por ser de origem vegetal, proporciona diversas vantagens, entre elas a padronização dos componentes e a eliminação dos riscos de contaminação (Fukui et al., 2008).

2.6. CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação do sêmen é uma biotecnologia de extrema utilidade para criadores de cães, pois uma das principais vantagens é o possível armazenamento do material genético de animais de alto valor zootécnico por um período ilimitado, transmitindo as características desses animais por várias gerações mesmo após a morte do animal, além disso, a inseminação artificial com sêmen congelado elimina os riscos de transmissão de algumas doenças sexuais, evita o estresse do animal com o transporte e permite o aproveitamento de machos velhos ou cães que apresentam doenças adquiridas que não estejam aptos a realizar a monta natural (Stockner, 1995).

No Brasil, a primeira notificação de sucesso em inseminação artificial com sêmen canino congelado foi realizada há pouco mais de 30 anos, tendo sido obtida uma ninhada de seis cães normais da raça Boxer (Vaske et al., 1981).

A criopreservação de células vivas se fundamenta no fato de que, teoricamente, após o resfriamento e permanência a temperaturas extremamente baixas, os espermatozoides entram em um estado de quiescência, reduzindo o metabolismo e proporcionando uma diminuição nos gastos energéticos e na produção de catabólitos tóxicos, contribuindo para a preservação celular e portanto, podem ser mantidas viáveis por longos períodos, de modo que após a descongelação voltariam a desenvolver suas atividades normais, devido a temperatura do nitrogênio líquido de 196°C (Bateman, 2001).

Ainda existem muitos fatores que influenciam na sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides criopreservados. A maioria das alterações causadas pelo estresse térmico se inicia na membrana espermática (Jasko, 1994; Holt, 2000). A alteração da temperatura, alterações de osmolaridade, pressão ou pH pode determinar mudanças na estrutura e organização da bicamada de fosfolipídios (Gennis, 1989).

Existem ainda alguns elementos do citoesqueleto espermático sensíveis a alterações de temperatura, como é o caso dos filamentos de actina. A despolimerização da F-actina é uma das etapas necessárias para permitir a aproximação da membrana plasmática e da membrana acrossomal externa, promovendo a exocitose acrossomal, assim, esta possa ser uma das explicações para a fusão desorganizada das membranas após o resfriamento e a criopreservação dos espermatozoides (Watson, 2000).

Na metodologia de congelamento observa-se que existe uma ampla variedade de protocolos e em todas busca-se minimizar o dano causado ao espermatozoide pelo

processamento, visando recuperar um máximo possível de espermatozoides viáveis (Strom et al., 1997). O método de criopreservação de sêmen canino mais usual é realizado a diluição do sêmen a 37°C em Tris acrescido de gema de ovo e glicerol. Em seguida, foi procedido um período de equilíbrio de três horas, seguido do envase em palhetas plásticas e a exposição aos vapores de nitrogênio para só então mergulhar as palhetas em nitrogênio líquido (Andersen, 1975).

O processo de criopreservação do sêmen ocorre em 5 fases: 1) diluição e resfriamento; 2) adição do crioprotetor; 3) congelamento em nitrogênio líquido; 4) armazenamento e 5) descongelamento. Os métodos para cada uma destas etapas devem ser desenvolvidos de acordo com a espécie, porque cada etapa impacta de forma decisiva no sucesso da criopreservação (Hammerstedt et al., 1990).

O processo de descongelamento mais usado para o sêmen de cão é imergir as amostras em banho-maria a 75°C durante 6 segundos, e depois imergir em água a 37°C durante 30 segundos (se em palhinhas de 0,25mL) ou 60 segundos (se em palhinhas de 0,50mL ou pellets) (Johnston et al., 2001).

2.7. SONDAS FLUORESCENTES

A descoberta de uma variedade de fluorocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes aumentaram a possibilidade de análise mais precisa e criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides, avaliando a qualidade bioquímica, estrutural e funcional do sêmen. Atualmente, uma grande variedade de sondas fluorescentes tem sido usada isoladamente ou em associação, pois a combinação destas possibilita a avaliação de diversos compartimentos espermáticos, simultaneamente. Por intermédio da microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo é possível avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal, juntamente com o potencial mitocondrial, dentre outros parâmetros (Arruda et al., 2003; Celeghini et al., 2007; Gardes et al., 2010).

Essa técnica vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas da célula espermática, de forma isolada ou em conjunto, podendo ser usada para determinar a integridade das membranas e ser visualizadas separadamente ou simultaneamente, usando diferentes filtros (Arruda et al., 2010). A avaliação simultânea da integridade da membrana plasmática e da função mitocondrial aumenta a acurácia da

análise do sêmen, pois fornece maior número de dados para a determinação da porcentagem de células espermáticas na amostra, com capacidade para fertilizar o ovócito (Vasconcelos, 2015).

2.7.1. Integridade da membrana plasmática

Sondas fluorescentes que apresentam afinidade pelo DNA têm sido atualmente utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática das células espermáticas (Aurich, 2005; Silva; Gadella, 2006). Dentre estas, destacam-se o Hoechst 33342 (H33342), a SYBR-14 e o diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA), Hoechst 33258 (H258), TOTO, YoPro-1 e iodeto de propídio (IP) (Hinsch et al., 1997; Esteves et al., 2000; Martin et al., 2004; Cunha; Lopes, 2005; Aurich, 2005; Singh, 2006; Souza et al., 2007), os últimos quatro somente penetram nas células com membrana plasmática danificada e, por possuírem afinidade ao DNA, ligam-se a este com emissão das fluorescências azul, verde e vermelho, respectivamente (Guerra et al., 2009).

O iodeto de propídio é incapaz de penetrar a membrana íntegra, contudo atravessa a membrana lesada e uma vez dentro da célula, liga-se ao material genético, emitindo fluorescência vermelha (Maxwell et al., 1997; Arruda et al., 2003). Por ser um corante muito estável, o IP tem-se evidenciado, apresentando êxito tanto nos resultados em microscopia de fluorescência quanto em sistema de citometria de fluxo. As sondas H258 e H33342 coram o núcleo de azul, contudo a H33342 é capaz de atravessar a membrana intacta, já o H258 somente a membrana lesada (Celeghini, 2005; Gillan et al., 2005; Arruda et al., 2010). O CFDA é um substrato incolor e hidrolisado rapidamente por esterases não específicas no interior da célula, produzindo o diacetato de carboxifluoresceína livre. Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) permite avaliar a integridade da membrana plasmática devido às suas características moleculares, sendo proposto o mecanismo de ação desses corantes fluorescentes, de modo que o DIC, por conter radicais acetil, consegue transpor a membrana intacta, sendo imediatamente desacetilada por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável e fazendo com que as células íntegras corem-se em verde. (Garner et al., 1997; Arruda et al., 2010). O SYBR-14 cora o núcleo das células com a membrana plasmática íntegra em verde (Aurich, 2005).

A análise realizada com o YoPro-1 é barata, rápida e de fácil execução, fornecendo informações a cerca das modificações de membrana em função da apoptose, uma vez que este corante, apesar de não penetrar a célula íntegra, atravessa a membrana da célula apoptótica, em virtude da modificação na sua permeabilidade. Para a identificação de apoptose, o YoPro-1 pode ser associado ao IP (Martin et al., 2004), o que permite a diferenciação dos graus de alteração da membrana (Ortega Ferrusola et al., 2009), visto que as células apoptóticas são permeáveis ao YoPro-1, mas não ao IP (Martin et al., 2007). Um caminho alternativo para a avaliação da membrana plasmática são os corantes penetrantes, tais como o diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e o SYBR-14®, os quais podem ser empregados isolados ou em associação aos corantes não penetrantes (Silva; Gadella, 2006).

O DCF é um éster não polar, não fluorescente e penetrante à membrana plasmática intacta, que sofre hidrólise por esterases inespecíficas no interior da célula e, a partir disto, é convertido em carboxifluoresceína, que fluoresce em verde e é não penetrante à membrana plasmática íntegra (Aurich, 2005; Silva; Gadella, 2006). Em contrapartida, o SYBR- 14® é uma sonda penetrante específica de DNA, corando as células íntegras em verde fluorescente (Aurich, 2005; Singh, 2006).

Dentre as associações de sondas fluorescentes penetrantes e não penetrantes, utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática, pode-se destacar as de DCF com IP (Garner et al., 1986; Assumpção et al., 2003) e de SYBR-14® com IP (Gravance et al., 2001; Nagy et al., 2003). Tais metodologias são efetivas para a determinação da viabilidade espermática e permitem a diferenciação entre as células com membrana plasmática lesada e intacta, fato que tem disseminado seu emprego (Gravance et al., 2001; Aurich, 2005).

2.7.2. Integridade do Acrossoma

A integridade do acrossoma é comumente avaliada por meio das lectinas conjugadas a sondas fluorescentes, as quais interagem com glicoconjugados exclusivamente localizados no acrossoma ou com a matriz acrossomal. Dentre as lectinas conjugadas estão a *Pisum sativum agglutinin* (PSA) e a *Arachis hypogaea agglutinin* (PNA), sendo normalmente utilizados para este tipo de análise o FITC-PNA

(isotiocionato de fluoresceína - *Arachis hypogaea agglutinin*), TRITC-PNA e RPE-PNA (Holt, 2000; Silva; Gadella, 2006; Arruda et al., 2007).

Quando o FITC-PSA é usado para a avaliação do acrossoma, os espermatozoides que possuem integridade acrossomal não são corados, uma vez que, neste caso, o contato da sonda fluorescente com o conteúdo acrossomal, ao qual se liga, não é efetivado pelo fato desta não entrar na membrana acrossomal íntegra. Por outro lado, em células que apresentam acrossomas danificados, o FITC-PSA entra em contato com o conteúdo acrossomal e se liga a α -manose e a α -galactose da matriz acrossomal, corando esta região em verde amarelado fluorescente (Graham, 2001; Arruda et al., 2007; Celeghini et al., 2007).

Quando é usado o FITC-PNA para a avaliação da integridade do acrossoma, este agente se liga a β -galactose associada à pequena porção da membrana acrossomal externa de espermatozoides portadores de acrossoma intacto, corando-os com uma fluorescência verde brilhante. No entanto, em acrossomas reagidos e onde existem áreas lesionadas na membrana acrossomal, o corante não consegue se ligar a β -galactose nas áreas comprometidas, apresentando-se os espermatozoides corados em verde fluorescentes apenas na região equatorial da cabeça ou não corados em toda a extensão da cabeça (Roth et al., 1998; Graham, 2001).

No caso do TRITC-PNA (Tetramethylrhodamine isothiocyanatelabeled peanut agglutinin), os espermatozoides portadores de acrossomas íntegros são permeados por esta sonda com manifestação de fluorescência vermelha na cabeça espermática, enquanto que nos portadores de acrossomas reagidos apenas a região equatorial fluoresce. Por outro lado, o RPE-PNA (*R-phycoerythrin peanut agglutinin*) possibilita uma avaliação precisa da integridade acrossomal, caracterizada pela emissão de fluorescência vermelha alaranjada pelas células com acrossomas reagidos e pela não fluorescência nas células com acrossomas íntegros (Nagy et al., 2004; García et al., 2007; Lim et al., 2008).

2.7.3. Potencial Mitocondrial

A mensuração do potencial de membrana mitocondrial é realizada em virtude do importante papel biológico desempenhado pelas mitocôndrias, dispostas helicoidalmente na peça intermediária dos espermatozoides. O ATP produzido por estas estruturas serve como matriz energética para os movimentos flagelares (Cosson, 1996).

Sendo assim, a integridade e a funcionalidade mitocondrial relacionam-se positivamente com a motilidade (Rodriguez-Martinez, 2005).

As rodaminas e as carbocianinas são moléculas sensíveis ao potencial de membrana mitocondrial e não apresentam toxicidade ao espermatozoide (Reers et al., 1991). Estas sondas são transportadas para o interior da célula pela respiração mitocondrial, portanto, quanto mais funcional mais corante será acumulado. Mais comumente utilizadas, a Rodamina 123 (R123) e o MitoTracker red ou Chloromethyl-X-rosamine (CMXRos) são capazes de corar mitocôndrias em células vivas, promovendo imagens de alta fluorescência em verde para a R123 e vermelha para CMXRos (Benel et al., 1986). Entretanto, células vivas coradas com CMXRos exibiram muito mais fluorescência fotoestável do que as coradas com R123 (Poot et al, 1996). Ambas as sondas apresentam algumas limitações, uma delas é corar todas as células com função mitocondrial, não possuindo assim, capacidade de diferenciar membranas de alto ou baixo potencial (Graham; Moce, 2005).

Para superar esta limitação pode ser utilizada a sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), um multímero de carbocianina que permite distinguir diferentes potenciais de membrana por meio de códigos de cor. A fluorescência emitida altera do verde para o laranja ou vermelho de acordo com o aumento do potencial de membrana (Reers et al., 1991). Visto que, a incapacidade fertilizante dos espermatozoides pode ser proveniente de diversos fatores, a avaliação simultânea dos diferentes compartimentos da célula espermática permite prognóstico mais acurado sobre a integridade desta célula como um todo (Graham, 2001). Neste contexto, as associações de sondas fluorescentes têm sido realizadas com precisão para a análise da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial (Andrade et al., 2007; Arruda et al., 2007; Celeghini et al., 2007; Celeghini et al., 2010; Csermak Junior, 2011).

2.8. ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN (CASA)

As variações relatadas na estimacão da motilidade espermática (Mortimer et al., 2000) e dos parâmetros morfológicos (Baker et al., 1987; Kruger et al., 1995) do ejaculado avaliado por observadores diferentes implicam uma necessidade absoluta para

métodos objetivos e padronizados, para as finalidades clínicas e das pesquisas reprodutivas (Smith; England, 2001). Isto conduziu ao desenvolvimento de diversos dispositivos de medição semi-computadorizado (England; Allen, 1990; Rijsselaere et al., 2002) e computadorizado para a avaliação da qualidade do sêmen canino (Smith; England, 2001; Rijsselaere et al., 2004).

Diversos sistemas de análises computadorizadas do sêmen como o Computer Assisted Sperm Analyses – CASA tem sido propostos e aplicados na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação tradicional do sêmen, além de proporcionar o conhecimento de mais dados no estudo da andrologia humana e das espécies animais (Verstegen et al., 2002; Matos et al., 2008).

O Computer Assisted Semen Analysis (CASA) é um sistema automatizado para visualizar e capturar imagens sucessivas dos espermatozoides, processando, analisando e fornecendo informações mais precisas e significativas da cinética individual das células espermáticas (Amann; Katz, 2004).

Este sistema foi desenvolvido por volta dos anos 1980 e foi proposto como uma ferramenta que poderia substituir a avaliação subjetiva e aprimorar a rotina laboratorial por apresentar maior rapidez em fornecer informações mais consisas, relativas à concentração, morfologia e qualidade de movimento das células espermáticas, técnicas que geralmente exigem tempo na execução (Mortimer et al., 2000).

Em especial, a avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é importante devido a cinética espermática apresentar influência significativa na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (Matos et al., 2008), pois através na análise desta motilidade a informação de um fator que é necessário para a capacidade fertilizante do espermatozoide é fornecida, dada pela manifestação da sua competência estrutural e funcional (Peña-Martinez, 2004).

Embora na espécie canina já tenham reportado que a motilidade está geralmente relacionada à integridade da membrana plasmática e à morfologia, a existência de correlações entre motilidade espermática e fertilidade *in vivo* ou *in vitro* permanece ainda não tão bem esclarecida e mesmo em outras espécies, essas relações entre motilidade e fertilidade ainda são bastante conflitantes (Silva, 2005).

O sistema CASA analisa de forma rápida diferentes parâmetros seminais, como motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN),

retilinearidade (STR) e índice de oscilação ou wobble (WOB), expressos em porcentual; velocidade curvilínea (VCL), que é a velocidade da trajetória real do espermatozoide, velocidade em linha reta ou linear (VSL), que é a velocidade em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e último ponto da trajetória do espermatozoide, e velocidade média do percurso (VAP), que é a velocidade média da trajetória do espermatozoide, expressos em $\mu\text{m/s}$; frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expresso em Hz; e amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH), expresso em μm (Mortimer, 2000; Iguer-Ouada; Verstegen, 2001; Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003; Amann; Katz, 2004). Os parâmetros VCL, VSL e VAP definem quantitativamente o movimento dos espermatozoides, enquanto que LIN, STR, WOB, ALH e BCF definem a qualidade da cinética espermática (Matos et al., 2008).

Além destas avaliações, o CASA realiza a subdivisão das populações espermáticas de acordo com a categoria de seus movimentos, em rápidos, médios, lentos e espermatozoides estáticos (Rijsselaere et al., 2007), e ainda, permite a avaliação da morfologia e concentração espermática (Rijsselaere et al., 2005).

Os problemas principais destes sistemas de medição computadorizados são os elevados custos de investimento e a necessidade de padronização e validação do sistema antes que todo o uso prático esteja possível (Iguer-Ouada; Verstegen, 2001; Smith; England, 2001; Rijsselaere et al., 2003).

Em cães, as alterações significativas das características da motilidade medidas por sistemas de CASA foram descritas devido à diluição da amostra do sêmen, do diluente usado, da temperatura da análise e da câmara de contagem. Uma vez que estes sistemas foram padronizados, um grau elevado de repetibilidade pode ser conseguido com coeficientes de variação inter e intra ensaios $<12\%$ para maioria dos parâmetros (Iguer-Ouada; Verstegen, 2001; Smith; England, 2001; Rijsselaere et al., 2003).

Se verificou ainda, uma relação significativa entre padrões de motilidade avaliados pelo CASA: VAP, VSL e frequência de batimento cruzado (BCF), com interações *in vitro* entre espermatozoides caninos congelados-descongelados e oócitos homólogos, evidenciando assim a utilização do CASA como uma ferramenta auxiliar para avaliação espermática canina (Silva, 2005).

A biotecnologia da recuperação de espermatozoides epididimários em cães, no município de Teresina, Piauí não é aplicada na prática da reprodução canina e a escolha

dos diluidores que serão empregados na recuperação e avaliação espermática, podem ser muito úteis para uma possível refrigeração e criopreservação deste material genético, podendo dessa forma, auxiliar como recurso reprodutivo para aqueles animais de alto valor comercial ou afetivo que precisam ser esterilizados ou que vêm a óbito de forma súbita. Além disso, serão analisadas as características seminais quanto aos parâmetros que influenciam direta e indiretamente na fertilidade destes animais, podendo, se tornar mais uma ferramenta biotecnológica de fácil acesso aos criadores de cães que se interessem por essa temática.

Este trabalho pode servir como mais uma ferramenta da biotecnologia aplicada à reprodução animal, já que serão empregadas duas técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários de cães e avaliados sob dois diluidores utilizados na prática reprodutiva, sendo um de origem animal, amplamente difundido na reprodução animal e o outro, de origem vegetal, pouco difundido, apesar de resultados satisfatórios.

Estes dados poderão dar suporte para o mercado pet, quanto à conservação do material genético dessa espécie animal.

Desta forma objetivou-se avaliar a taxa de recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo de cães, após a orquiectomia, utilizando as técnicas de flutuação e fluxo retrógrado, bem como avaliar a viabilidade destes espermatozoides recuperados em meio diluidor tris-gema de origem animal (gema de ovo).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; LEE, D. S.; SANO, H.; AKIYAMA, K.; YANAGIMOTO-UETA, Y.; ASANO, T. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n.4, p. 290-294, 2008.

AIRES, V. A.; HINSCH, K. D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, n.2, p. 269-279, 2003.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. The epididymis and sperm maturation: a perspective. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, n.4, p. 361-381, 1993.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, n.3, p.317-325, 2004.

ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n.2, p. 190-194, 2007.

AQUINO-CORTEZ, A. **Avaliação dos componentes bioquímicos do líquido prostático e suas correlações com a qualidade espermática canina**. 2003. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, CE, 2003.

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

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n.1, p. 8-16, 2007.

ARRUDA, R. L.; ORRO, I. R.; PASSOS, T. S.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.3, p. 168-184, 2010.

ASSUMPCÃO, M. E. O.D'. A.; HAIPECK, K.; LIMA, A. S.; MELLO, M. R. B.; OLIVEIRA, L. J.; OLIVEIRA, V. P.; TAVARES, L. M. T.; VISINTIN, J. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.39, n.3, p.149-156, 2002.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stores stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n.1-4, p. 65-75, 2005.

BAKER, H. W. G.; CLARKE, G. N. Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different observers. **Clinical Reproduction Fertility**, v. 5, n.1-2, p. 37-43, 1987.

BAPTISTA SOBRINHO, C. A.; HAKAMOTO-ZERVOUDAKIS, L. K.; BARNABE, V. H.; NICHI, M.; OLIVEIRA, C. A. Efeitos do estresse de trabalho sobre parâmetros seminais de cães da raça Rottweiler. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 46, n. 4, p. 280-287, 2009.

BARBOSA, C. C. **Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®): Efeito da temperatura de adição do glicerol e da adição de antibiótico**. 2007, 82p. Dissertação: (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2007.

BARTELS, P.; LUBBE, K.; SMITH, R. L.; GODKE, R. A. Morphological changes of caudal epididymal spermatozoa of african buffalo (*Syncerus caffer*) after storage at 6°C. **Theriogenology**, v. 51, p. 279, 1999.

BATEMAN, H.L. **Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival**. 2001. 102f. Thesis (master). University of Guelph, Canadá. 2001.

BELLEANNEE, C.; CALVO, E.; THIMON, V.; CYR, D. G.; LEGARE, C.; GARNEAU, L.; SULLIVAN, R. Role of microRNAs in controlling gene expression. I diferente segments of the human epidymis. **PLOS One**, v.7, n.4, p. e34996, 2012.

BENEL, L.; RONOT, X.; KORPROBST, M.; ADOLPHE, M.; MOUNOLOU, J. C. Mitochondrial uptake of rhodamine 123 by rabbit articular chondrocytes. **Cytometry**, v. 7, n.3, p. 281-285, 1986.

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

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Determinação da concentração espermática no sêmen de cães Pastores Alemães através da espectrofotometria. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 384-386, 2003.

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

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.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª ed., Belo Horizonte, 2013.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ALBUQUERQUE, R.; SILVA, F. H. A.; FARIA DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes in fowl spermatozoa. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, n.3, p. 143-149, 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.3, p. 536-543, 2010.

CHANDLER, J. A.; SINOWATZ, F.; PIERREPOINT, C. G. The ultrastructure of dog epididymis. **Urological Research**, v.9, n.1, p. 33-44, 1981.

CHRISTIANSEN, I. J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, p.363.1988.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. **Current Veterinary Therapy**, v.10, p.1247-1259, 1989.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v.20, n.1, p. 83-94, 1996.

CSERMAK JUNIOR, A. C. **Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozóide do cão *Canis (Lupus familiaris)* à membrana perivitelina do ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen**. 2011. 72 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

CUNHA, I. C. N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicina-gema**. 1997. 124f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. O. Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluidores à base de leite e glicina gema. **Continuous Education Journal CRMV-SP**, São Paulo.v. 3, fascículo 1, p. 037 - 042, 2000.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D. Efeito de três diferentes diluidores sobre o sêmen canino submetido a dois protocolos de descongelamento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n.5, p. 372-380, 2005.

DALMAZZO, A. **Utilização da lecitina de soja para a refrigeração e criopreservação do sêmen de cães**. 2012, 107p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.

DOBRINSKY, L.; LULAI, C.; BARTH, A. D.; POST, K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supl, 47, p. 291-296, 1993.

DREVIUS, L.O. Spiralization in tails of mammalian spermatozoa in hypotonic media. **Nature**, v. 197, p.1123–1124, 1963.

DREVIUS, L.O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 42, n.1, p. 136–156, 1966.

ENGLAND, G. C. W.; ALLEN, W. E. Evaluation of cellulose acetate/nitrate filter for measuring the motility of dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 88, n.1, p.369–74. 1990.

ENGLAND, G. C.; PLUMMER, J. M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl 47, p. 261–270, 1993.

ENGLAND, G. C. W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v.46, n.1, p.165-171, 1996.

ESTEVEZ, S.C. SHARMA, R. K.; THOMAS JUNIOR, A. J.; AGARWAL, U. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. **Human Reproduction**, Oxford, v.15, n.10, p.2173-2179, 2000.

FELDMAN, A., NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia:WB Saunders, p. 673-690.1996.

FELDMAN, E. D.; NELSON, R. **Canine and feline endocrinology and reproduction**.(3^a ed.). St. Louis, Manual Saunders, 2004.

FOUCHECOURT, S.; METAYER, S.; LOCATELLI, A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization: secretion and dynamics changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, v.62, n.6, p. 1790-1803, 2000.

FRESHMAN, J. L. Semen collection and evaluation. **Clinical Techniques Small Animal Practice**, v.17, n.3, p.104-107, 2002.

FREIRE, L. M. P.; SILVA, H.V. R.; MONTEIRO, C. L. B.; PINTO, J. N.; MOTA FILHO, A. C.; SILVA, L. D. M. Comparação de três diluidores para obtenção de espermatozoides epididimários de gatos domésticos pela técnica da flutuação. **Anais do VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, Ciência Animal**, p. 531-534, 2012.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, n.4, p. 286-289, 2008.

GARCÍA, E. M.; VÁZQUEZ, J. M.; PARRILLA, I.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; CABALLERO, I.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. L.; MARTÍNEZ, E. A. Improving the fertilizing ability of sex sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v.68, n.5, p.771-778, 2007.

GARDE, J.; AGUADO, M.; PEREZ, S.; GARRIDO, D.; PEREZ-GUZMAN, M.; MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. **Theriogenology**, v. 41, p. 2003, 1994.

GARDES, T. P.; CARDOSO, R. N. R.; ARRUDA, R. P.; NASCIMENTO, J.; SILVA,

D. F.; GALLEGO, A. M.; ANDRADE, A. F. C. Comparação da eficiência de meios para a capacitação dos espermatozoides através das análises por citometria de fluxo e computadorizada da motilidade. In: Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação do Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga. **Anais...** São Paulo: USP/FMVZ, 2010.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401-406, 1997.

GENNIS, R. B. **Biomembranes: molecular structure and function**. New York: Springer, p.533, 1989.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n.2, p. 445-457, 2005.

GONSALVES, O. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; V. J. F. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. São Paulo: Varela, p.340. 2003.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n.3-4, p. 239-247, 2001.

GRAHAM, J.K.; MOCE, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, n.3, p. 492-504, 2005.

GRANEMANN, L. C.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; MURADÁS, P. R.; TREML T. E. Número total de espermatozoides de garanhões obtidos através da colheita com vagina artificial e por fluxo retrógrado da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinar Science**, v.11, n.1, p.73-77, 2006.

GRAVANCE, C.G.; GARNER, D. L.; MILLER, M. G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, Hoboken, v.15, n.1, p.5-10, 2001.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Editora Manole. 7ªed. p. 513, 2004.

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.

HINSCH, E.; PONCE, A. A.; GELE, W. H. A.; HEDRICH, F. A new combined in vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. **Human Reproduction**, Oxford, v.12, n.8, p.1673-1681, 1997.

HISHINUMA, M.; SUZUKI, K.; SEKINE, J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. **Theriogenology**, v.59, n.3-4, p.813-820, 2003.

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.

HOWARD, J. G. Assisted reproductive techniques in non-domestic carnivores. *In*: FOWLER M. E., MILLER, R. E.(eds.), **Zoo and Wild Animal Medicine**. ed. Toronto: Saunders, p.449–457. 1999.

HORAN, A. H.; BEDFORD, J. M. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the syrian hamster. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 30, n.3, p. 417-423, 1972.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, JP. Evaluation of the “Hamilton Thorne computer based automated system” for dog semen analysis. **Theriogenology**; v. 55, n.3, p.733–49, 2001.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. **Theriogenology**, v.55, n.2, p.671-684, 2001.

INAMASSU, A.; UECHI, E.; LOPES, M. D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.302-304, 1999.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinária**, v.10, p.156- 65, 1994.

JERVIS, K. M.; ROBAIRE, B. Dynamic changes in gene expression along the the rat epididymis. **Biol Reprod**, v.65, n.3, p. 696-703, 2001.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. 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. 219-228, 1984.

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

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of

ram spermatozoa recovered postmortem. **Theriogenology**. v. 60, n.7, p.1249-1259. 2003.

KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C. A.; MAHI-BROWN, C. A.; OVERSTREET, J.W. Induction of acrosome reaction of canine sperm by homologous zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v.48, n.4, p.841-845, 1993.

KIKUCHI, M. MIZOROKI, S.; KUBO, T.; OHIWA, Y.; KUBOTA, H.; YAMADA, N.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Seminal plasma lactoferrin but not transferrin reflects gonadal function in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, n.6, p.679-684, 2003.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting the canine spermatozoa to the hypoosmotic swelling test. **Theriogenology**, v. 39, n.6, 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.

KRUGER, T. F; DU TOIT, T.C.; FRANKEN, D. R.; MENKVELD, R.; LOMBARD, C. J. Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyser IVOS. **Fertility and Sterility**. v.63, n.p.134–41, 1995.

LAMBRECHTS, H.; NIEKERK, F.; COETZER F.W.; CLOETE, S.; VAN, D. E. R.; HORST, G. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. **Theriogenology**. v.52, n.7, p.1241-1249. 1999.

LIM, J. J.; SUNG, S.Y.; KIM, K. S.; SONG, S. H.; LEE, W. S.; YOON, T. K.; LEE, D. R. Effect of cholesterol supplementation in freezing medium on the survival and integrity of human sperm after cryopreservation. **Korean Journal of Reproductive Medicine**, Coréia, v.35, n.3 p. 203-212, 2008.

LOVE, C. Stallion semen evaluation and interpretation. **Proceedings Society for Theriogenology**. p. 93-102. 2002.

MADEIRA, V. L. H.; SILVA, L. D. M.; CARDOSO, J. F. S.; SILVA, A. R.; UCHOA, D. C.; CARDOSO, R. C. S.; OLIVEIRA, C. M. Uso da água de coco em pó (ACP®) como diluidor para conservação do sêmen de cães a 4°C. In: IX SEMANA UNIVERSITÁRIA - UECE, 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, UECE, 2004,

MADEIRA, V. L. H. **Criopreservação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP - 106®): efeito do tempo de equilíbrio e da taxa de descongelamento**. 2007, 107p. Dissertação (Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2007.

MANN, T.; L-MANN, C. **Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids: applications to andrological problems.** In: Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Berlin: Springer Verlag, p.269-336, 495. 1981.

MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DE SÊMEN ANIMAL. CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal: Belo Horizonte, 2013.

MARKS S. L.; DUPUIS J.; MICKELSEN W.D.; MEMON M.A.; PLATZ C.C. J. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association.** v.204, n.10, p.1639-1640, 1994.

MARTIN, G.; SABIDO, Ó.; DURAND, P.; LEVY, R. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.71, n.1, p.28-37, 2004.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v.65, n.3, p. 471-485, 2006.

MARTINEZ-PASTOR F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; DIAZ, A.R.; ANAL, E.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on post-mortem time. **Theriogenology.** v. 63, n.1, p.24-40. 2005.

MARTINS, C. F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D. C; DODE, M. N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.101, n. 3-4, p.326-331, 2007.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.3, p.225-32, 2008.

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

MENDONÇA, R.A.B. **Características de sêmen canino refrigerado – Comparação entre três diluidores diferentes.** Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal. 2010. 79p.

MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; SARATIS, P. H.; VERVERIDIS, H. N.; BOSCOS, C. M. Quality and reactive oxygen species of extended canine sêmen after vitamin C supplementation. **Theriogenology**, v.70, p.827-835, 2008.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; FRASER, L.; CZARZASTA, J.; KORDAN, W. Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.15, p.493-498, 2012.

MORTIMER, S. T. Casa- Practical aspects. **Journal Andrologic**, p.515-524, 2000.

MOTA FILHO, A. C.; SILVA, H.V.R.; FREIRE, L. M. P; PINTO, J. N.; FREITAS, L. A.; SILVA, L. D. M. Obtenção de espermatozoides epididimários utilizando diferentes diluidores em cães soropositivos para leishmaniose visceral canina. **Anais do VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal**, Ciência Animal, p. 564-567, 2012.

MOTA FILHO, A.C.; SILVA, L.D.M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.1, p. 1-8, 2012.

MOTA FILHO, A. C. **Conservação de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de cães**. 2014. 78f. (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2014.

MORATO, R. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; NUNES, A. L.V.; CARCIOFI, A. C.; FERREIRA, F.; BERNABE, V. H.; BERNABE, R. C. Colheita e avaliação em onça pintada (*Panthera onca*). **Brazilian Journal of Veterinary Reserch and Animal Science**, São Paulo, n.35, v.4, p.1-9. 1998.

MURADÁS, P. R.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; GRANEMANN, L. C.; SANTOS, I. W.; PIMPÃO, C. T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v.11, p. 69-74, 2006.

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E. K.; GADELLA, B. M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosomemembrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.68, n.5, p.1828-1835, 2003.

NOTHLING, J.O.; GERSTENBERG, C.; VOLKMANN, D.H. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh quality in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, p.109-116, 1997.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA E PRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1., 1995, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, p.53-63. 1995

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v.1, n.1, p.17-26, 1999.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; GONDIM, J. M. Novos produtos com base na água de coco em pó. In: 12ª SEMANA INTERNACIONAL DA FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA - FRUTAL 2005, Fortaleza. **Anais ...**, Fortaleza: FRUTAL, 2005.

OETTLÉ, E. E.; SOLEY, J. T. Infertility in a malttese poodle as a result of a sperm midpiece defect. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.56, n.2, p.103-106, 1985.

OETTLÉ EE, SOLEY JT. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 59, p. 28-70, 1988.

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

OLIVEIRA E. C. S. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino**. 2003, 61p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

OLIVA, S. U.; RINALDO, P. A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: Maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**. n.33, p.419-425, 2009.

ORTEGA, C. F.; GONZÁLEZ, F. G.; MORRELL, J. M.; SALAZAR, S. C.; MACIAS, G. B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PENA, F. J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, Cambridge, v.138, N. 55-63, p.55-63, 2009.

PEÑA, A. I. **Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity**. 2000. 86f. Thesis (Doctorat) – Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, 2000.

PEÑA-MARTINEZ, I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 209-224, 2004.

PINTO, C. R. F.; KOZINK, D.M. Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 2007.

POOT, M; ZHANG, Y. Z.; KRAMER, J. A.; WELLS, K. S.; JONES, L. J.; HANZEL, D. K.; LUGADE, A. G.; SINGER, V. L.; HAUGLAND, R. P. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, p. 1363-1372, 1996.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A.; SCHULMANN, L. L. Loss of boar sperm fertilizing capacity associated with altered acrosome morphology during in vitro storage. In: VIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, **Proceedings...**Munich, v.3, p.141-1525-1600, 1972.

PURSWELL, B. J.; LTHOUSE, G. C.; ROOT, M. V. Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. In: **Annual Meeting of the Society for Theriogenology**, 1992.

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

REGO, J. P. A.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N. J.; CORBET, D. H.; QUEIMADURAS, B. M.; BOE-HANSEN, G. B.; MCGOWAN, M. R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v.148, p.1-17, 2014.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Use of the Sperm Quality Analyzer (SQA-IIC) for the assessment of dog sperm quality. **Reproduction Domestic Animals**, v. 37, p. 63-158, 2002.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton–Thorne analyser. **Theriogenology**, v. 60, p. 68-1553, 2003.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; HOFACK, G.; KRUIF, A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton–Thorne analyser. **Theriogenology**; v. 62, p.306-1292, 2004.

RIJSSELAERE, T.; SOOM, A.V.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**, v.64, p.706–719, 2005.

RIJSSELAERE T.; MAES, D.; HOFACK, G.; KRUIF, A.; SOOM, A.V. Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne Analyser. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.143–148, 2007.

RODRIGUEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, p.815–829, 1994.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia - GO. **Anais... Palestra...** Belo: Horizonte - MG: CBRA, 2005.

ROTH, T.L.; WEISS, R. B.; AMARELO, J. L.; BUSH, L. M.; WILDT, D. E.; BUSH, M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar- Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v.58, n.2, p.475-482, 1998.

SAENGSOI, W. SHIA, W. Y.; SHYU, C. L.; WU, J. T.; WARINRAK, C.; LEE, W. M.; CHENG, F. P. Detection of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in canine seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, v.127, n.1-2, p.114-119, 2011.

SAMPAIO NETO, J. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J. F. Utilization of ACP 105® extender in the refrigeration of stallion semen. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v.5, p.137-139, 2002.

SANTOS, S. E. C.; VANNUCCHI, C. I. . Inseminação Artificial em Cães. **Clínica Veterinária** (São Paulo), São Paulo, v. 2, n. 6, p. 22-24, 1997.

SANTOS, A. D. F; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J.F.; BORGES, A. M.; ROVAY, H.; GORETTI, R. G.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; BARBOSA, L. P.; MAFFILI, V.V.; FRAGA, D. B. M. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, 2001.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SALGUEIRO, C. C.M.; NUNES, J. F.; OLIVEIRA, K. P. L.; VIEIRA, V. E.; GONDIM, J. M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl., n.5, p.96-98, 2002.

SALVIANO, M. S.; SOUZA, J. A. T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.3, p.159-167, 2008.

SEAGER, S. W. J.; PLATZ, C. C. Collection and evaluation of canine semen. **Veterinary Clinics of North America**, v.7, p.757-764, 1977.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. C.; SILVA, L. D. M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, p. 53-60. 2003.

SILVA, A. R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: Avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos**. 2005. 146p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

SILVA, L. D. M., SILVA, A. R., CARDOSO, R. C. S. Inseminação artificial em cães. In: GONSALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V.J.F. (eds.) **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. ed São Paulo: Varela, p. 69–95. 2002.

SIRIVAIIDYAPONG, S. **Motility and viability of canine epididymal sperm collected by different methods.** In: Third EVSSAR (European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals), Proceedings... Liège, Belgium. p.170. 2002

SHAHIDUZZAMAN, A. K.; LINDE-FORSBERG, C. Induced immotility during long-term storage at +5 degrees C does not prolong survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n.6, p. 920-933. 2007.

SHIVAJI, S. Seminal plasmin: a protein with many biological properties. **Bioscience and Reproduction**, v.8, p.609-618, 1988.

SILVA, A. R.; SATZINGER, S.; LEITE, L. G.; SILVA, L.D.M. Gestação obtida por inseminação artificial com sêmen canino refrigerado transportado à distância – relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, ano IX, n.50, p.56-63, 2004.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, Stoneham, v.65, p.958-978, 2006.

GUERRA, M. P.; SILVA, S. V.; BATISTA, A. M.; COLETO, Z. F. Diferentes Métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v.12, p.1-15, 2009.

SINGH, B. K. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda.** São Paulo: Andrei Editora , p.331. 2006.

SMITH, S. C.; ENGLAND, G. C. W. Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured by computer-aided sperm analysis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p.151–9, 2001.

SOUZA, F. F.; BARRETO, C. S.; LOPES, M. D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. **Theriogenology**, v. 68, p. 100-106, 2007.

STOCKNER, P. K. **Status of the canine frozen semen industry.** Modern Veterinary Practica, v.66, n.2, p.98-100, 1995.

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

SULLIVAN, R.; SAEZ, F.; GIROUARD, J.; FRENETTE, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.35, p.1-10, 2005.

UCHOA, D. C.; SILVA, T. F. P.; ARAUJO, A. A., SILVA, L. D. M. Uso da água de coco em pó (ACP 106®) na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas. In: IX SEMANA UNIVERSITÁRIA – UECE, 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, UECE, 2004.

UCHOA, D.C.; SATZINGER, S.; AMARAL, M,C.; SILVA, L.D.M. O uso de diferentes diluidores para inseminação artificial com sêmen canino refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Curitiba. **Anais...** Belo Horizonte, CBRA, 2007.

VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães - aspectos práticos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.3, n.15, p.22-7, Jul. 1998.

VASCONCELOS, G. S. C. **Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de cão (*Canis lupus familiares*).** 2015, 49p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, MG, 2015.

VASKE, T.R.; MORAES, H. F.; ROMÃO, A.R.; BLASI, A.C.; PERASSI, P.; AUN, G.C. Seis cães normais nascidos de sêmen congelado. **A Hora Veterinária**, v.1, p.15-18, 1981.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

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

VON KOLLIKER, A. Pyshologische studien uber die Samenflussigkeit. **Z. Wiss. Zool.** v.7, p. 201–272. 1856.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility whith cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60, n. 61, p.481-492, 2000.

WILDT, D. E. Reproduction: Assessment, Management and Control of Fertility. In: Kleiman, D. G., Allen, M. E., Thompson, K. V., Lumpikin, S. (Eds.) **Wild mammals in captivity: Principles and techniques**. Chicago: The University of Chicago Press, p. 429-44. 1996.

YU, I.; LEIBO, S. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. **Theriogenology**, v. 57, p. 1179-1190, 2002.

ZULIANI, T.; DUVAL, R.; JAYAT, C.; SCHNÉBERT, S.; ANDRÉ, P.; DUMAS, M.; RATINAUD, M. H. Sensitive and Reliable JC-1 and TOTO-3 Double Staining to Assess Mitochondrial Transmembrane Potential and Plasma Membrane Integrity: Interest for Cell Death Investigations. **Cytometry Part A**, Hoboken, v.54A, n.2, p.100-108, 2003.

CAPÍTULO I

Eficiência de duas técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários de cães e avaliação seminal pós-criopreservação

[Efficiency of two techniques for recovering epididymal spermatozooids from dogs and seminal evaluation post cryopreservation]

S. T. P. Lopes^{1*}, J. A. T. Souza¹

¹Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina, Piauí

*sabrina.pereiralopes@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo de cães orquiectomizados, utilizando as técnicas de fluxo retrógrado (FR) e flutuação (FL) em meio diluidor tris-gema, antes e após criopreservação. Foram coletados 30 complexos testículo-epididímo (CTE) dos animais, sendo 15 para FR e 15 para FL e após adição de 3 mL do diluidor foram avaliados os parâmetros de motilidade total (MOT) e vigor (V) espermáticos. Em seguida, o material seminal foi criopreservado e realizado o teste de termorresistência (TTR) dos espermatozoides nos tempos T0, T30, T60 e T90 minutos pós-criopreservação, bem como a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal por sondas fluorescentes e análise computadorizada do sêmen (CASA). Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre as técnicas testadas quanto à MOT e V espermáticos no sêmen fresco diluído (FR-MOT: 82,3% e V:3,4; FL-MOT: 79,6% e V: 3,2) e no pós-criopreservado (FR-MOT: 34% e V:2,8; FL-MOT: 30% e V: 2,7). A partir do T30 houve diferença significativa quanto a MOT e V espermáticos nas técnicas utilizadas (FR-MOT: 24% e V: 2,4; FL-MOT: 20% e V: 2,2). O tempo também prejudicou a integridade do acrossoma dos espermatozoides a partir do T30 (FL: 18,7% e FR: 14,6%). Quanto ao CASA, houve diferença estatística somente na motilidade progressiva (MOP) dos espermatozoides entre as técnicas utilizadas (FR-MOP: 8,3% e FL-MOP: 2,6%). Conclui-se que as técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários testadas neste trabalho podem ser utilizadas em cães recentemente castrados e na pós-criopreservação.

Palavras-chave: sêmen, epidídimo, canino, flutuação, fluxo retrógrado.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the recovery rate of sperm from the epididymis tail of orchietomized dogs, using the techniques of retrograde flow (FR) and flotation (FL) in tris-egg yolk extender, before and after cryopreservation. A total of 30 testis-epididymal complexes (CTE) were collected from the animals, 15 for FR and 15 for FL and after addition of 3 mL of the diluent, the parameters of total motility (MOT) and vigor

(V) were evaluated. Then, the seminal material was cryopreserved, thawed and soon after, the thermoresistance test (TTR) of the spermatozoa at T0, T30, T60 and T90 minutes was performed, as well as the integrity evaluation of the plasma and acrosomal membrane by fluorescent probes and computerized semen analysis (CASA). There was no statistical difference ($P > 0.05$) between the techniques tested for MOT and V spermatozoa in fresh diluted semen (FR-MOT: 82,3% e V:3,4; FL-MOT: 79,6% e V: 3,2) and post-cryopreserved (FR-MOT: 34% e V:2,8; FL-MOT: 30% e V: 2,7). From the T30 there was a significant difference regarding MOT and V sperm in the techniques used (FR-MOT: 24% e V: 2,4; FL-MOT: 20% e V: 2,2). The time also damaged the integrity of the sperm acrosome from the T30 (FL: 18,7% e FR: 14,6%). Regarding the CASA test, there was statistical difference only in the progressive motility (MOP) of spermatozoa among the techniques used (FR-MOP: 8,3% e FL-MOP: 2,6%). It is concluded that the epididymal sperm recovery techniques tested in this study can be used in recently castrated dogs and post-cryopreservation.

Keywords: semen, epididymis, canine, flotation, retrograde flow.

INTRODUÇÃO

A coleta de espermatozoides epididimários é utilizada, experimentalmente, em diversas espécies animais (Granemann, 2006; Mota Filho et al., 2013; Lima et al., 2016), sendo um recurso importante em casos de animais de alto valor genético ou de grande estima, que precisam ser esterilizados ou que vêm a óbito. A técnica possibilita, dentro de um determinado período de tempo, a recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo do animal e pode ser uma oportunidade para assegurar a preservação do material genético (Mota Filho; Silva, 2012), já que esses gametas, assim que recolhidos, são capazes de resistir à refrigeração, até serem, posteriormente, criopreservados (Martins et al., 2007).

A obtenção de espermatozoides epididimários é preferencialmente realizada por duas técnicas: flutuação e fluxo retrógrado. A primeira consiste em fatiar a cauda do epidídimo e deixá-lo em um meio diluidor para que os espermatozoides migrem para o meio e a outra promove um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo aplicando-se pressão aos vasos deferentes até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo (Garde et al., 1994; Yu; Leibo, 2002).

Na técnica de flutuação, o complexo testículo-epidídimo é lavado e dissecado até o isolamento completo da cauda do epidídimo e do ducto deferente, estes são posicionados sobre uma placa de Petri com um diluidor aquecido a 37°C. Em seguida, o fatiamento do epidídimo é realizado e a solução obtida é recuperada e avaliada. A técnica de fluxo retrógrado é muito indicada, pois as amostras obtidas apresentam um menor nível de contaminação e são de melhor qualidade em relação aos outros métodos (Martinez-Pastor et al., 2006).

A gema de ovo é comumente utilizada nos diluidores seminais pelo fato de proteger as células durante as etapas de congelamento e descongelamento, com ação característica sobre a membrana plasmática dos espermatozoides. Além de que sua utilização, juntamente com crioprotetores associados, constitui uma alternativa para criopreservação do sêmen canino (Salamon; Maxwell, 2000; Rizzoto et al., 2014).

Nesse contexto, este trabalho objetivou avaliar a taxa de recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo de cães, após a orquiectomia, utilizando as técnicas de fluxo retrógrado e flutuação, bem como avaliar a viabilidade destes espermatozoides em meio diluidor tris-gema após a criopreservação, podendo assim, oferecer mais uma ferramenta de biotecnologia aplicada à espécie canina.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí – UFPI sob o número de protocolo 304/17. Critérios de inclusão para avaliação da sanidade dos animais utilizados neste experimento foram estabelecidos através de exames andrológicos preconizados pelo CBRA (2013), além da realização de hemograma, bioquímica sérica e sorologia para leishmaniose visceral (LV) e brucelose.

As amostras sanguíneas dos trinta cães utilizados neste trabalho foram colhidas em tubos a vácuo com anticoagulante para realização de hemograma e sem anticoagulante para as análises de bioquímica sérica (ureia, creatinina, proteínas totais, albumina e globulina) e sorologia para LV e brucelose.

Os exames hematológicos e bioquímicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Piauí (HVU/UFPI) e a sorologia para LV canina foi realizada no Laboratório de Parasitologia do

Departamento de Parasitologia e Microbiologia da UFPI, utilizando o teste sorológico TRDPP®, kit comercial da Bio-Manguinhos, seguindo as recomendações do fabricante.

Na sorologia para brucelose foi utilizada a técnica de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) realizada no Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução da Fêmea, UFPI. Esta técnica consistiu no emprego de antígeno contendo proteínas e lipopolissacarídeos solúveis, extraídos da bactéria *Brucella ovis*, amostra Reo 198, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar®) e as provas foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Neste experimento, foram utilizados trinta complexos testículo-epidídimos (CTE) de cães machos aparentemente saudáveis, sexualmente maduros, com idade entre 2 a 8 anos de idade, pesando entre cinco e quinze quilogramas (kg), sem raça definida (SRD), sendo quinze CTE destes animais direcionados para cada técnica de recuperação de espermatozoides epididimários (flutuação e fluxo retrógrado).

A coleta dos trinta CTE foi realizada após a orquiectomia de cães provenientes de cirurgias eletivas realizadas no HVU/UFPI e em quatro clínicas veterinárias particulares do município de Teresina, Piauí. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos estéreis, previamente identificados, contendo solução salina (NaCl 0,9%) e levado para o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA/UFPI), até a realização do procedimento das técnicas, conforme metodologia proposta por Mota Filho (2014).

Na técnica de flutuação (FL), os epidídimos e os ductos deferentes foram dissecados até o isolamento completo da cauda do epidídimo e do ducto, estes foram posicionados sobre uma placa de Petri de 90x15mm de diâmetro e fatiados em cortes seriados, adicionados de 3 mL do diluidor tris-gema aquecido a 37°C, permanecendo por 10 minutos. Na técnica de fluxo retrógrado (FR), após a dissecação do epidídimo, foi aplicada uma pressão nos vasos deferentes por meio de uma lâmina de vidro até que o conteúdo da cauda do epidídimo saísse por meio de um corte realizado na junção com o corpo do epidídimo, sendo também colocados em placa de Petri, adicionados com a mesma quantidade e o mesmo diluidor supracitados.

O volume do sêmen recuperado por cada técnica foi mensurado em tubo de coleta do tipo falcon de 15mL. Em seguida, foram avaliados os parâmetros de motilidade total (0-100%), vigor espermático (1-5), concentração (espermatozoides/mL) e

morfologia espermática (%). A concentração espermática foi determinada pela técnica da Câmara de Neubauer, a morfologia pela técnica de “preparação úmida” e a leitura foi realizada sob microscopia de contraste de fases em objetiva de 20x. Nesta última, foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina e classificados em defeitos maiores e defeitos menores (Blom, 1973; CBRA, 2013). Os resultados foram anotados e tabelados para posterior avaliação estatística.

Logo após essa avaliação, os tubos de coleta com o sêmen diluído foram submetidos ao processo de refrigeração em geladeira até atingir a temperatura de 5 °C, sendo estabilizado por uma hora nesta temperatura. Em seguida, foram envasadas em palhetas de 0,5mL, previamente identificadas e colocadas a 5 cm da superfície de um isopor contendo nitrogênio líquido, durante cinco minutos e posteriormente colocados em botijão para criopreservação.

Após duas semanas desse procedimento, foi realizado o teste de termorresistência (TTR), onde as amostras de sêmen foram colocadas em microtubos de 1,5mL, incubadas a 37°C em banho-maria e avaliadas quanto à motilidade total e vigor espermático nos tempos T0, T30, T60 e T90 minutos, sob microscopia óptica em objetiva de 20x.

Foi avaliada a integridade da membrana plasmática espermática com o uso de sondas fluorescentes, conforme descrito por Harrison e Vickers (1990), onde alíquotas de 50 µL de sêmen foram diluídas em 150 µL de tris contendo 5 µL de Diacetado de Carboxifluoresceína (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de Iodeto de Propídio (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos a 37 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. A análise ocorreu pela contagem de 200 espermatozoides em microscópio de epifluorescência em objetiva de 40x. As células que apresentaram fluorescência verde foram consideradas com membrana plasmática íntegra, enquanto aquelas que apresentaram fluorescência vermelha foram consideradas danificadas.

Para análise do acrossoma foi utilizado o isocianato de fluoresceína conjugado (FITC-PNA). Uma alíquota de 100 µL da solução de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a 900 µL de PBS para obter a concentração final de 100 µg/mL. Alíquotas de 20µL desta solução foram inseridas sobre lâminas previamente preparadas com 10 µL de sêmen descongelado diluído em 990 µL de PBS e incubadas por 15 minutos em câmara úmida a 4 °C, na ausência de luz. Imediatamente antes da

avaliação, 5 μ L de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS, 5 mg de phenylenediamine, 5mg azida sódica) foi colocado sobre uma lâmina e coberto com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides, em objetiva de 100x, usando microscopia de epifluorescência. As células espermáticas foram classificadas como portadoras de acrossomas intactos (AI), quando a região acrossomal apresentou fluorescência verde brilhante e acrossoma reagido (AR), quando apresentou apenas na região equatorial da cabeça espermática a coloração verde ou fluorescência verde.

A análise Computadorizada do Sêmen foi realizada pelo sistema Computer-Assisted Semen Analyses (CASA) em software específico (Sperm Class Analyser®, Microptic S.L. versão 5.2.0), no Laboratório de Reprodução de Carnívoros da Universidade Estadual do Ceará (UECE), que consistiu na utilização de uma alíquota de 10 μ L do sêmen pós-criopreservado de cada amostra inserida em lâmina previamente aquecida a 37°C e analisado com auxílio de microscópio de contraste de fase acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema. Para cada amostra foram analisados quatro campos. Dentre os parâmetros avaliados foram registrados: motilidade total (MOT - %), motilidade progressiva (MOP - %), velocidade curvilínea (VCL - μ m/s), velocidade em linha reta (VSL - μ m/s), velocidade média do percurso (VAP - μ m/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %), índice de oscilação ou wobble (WOB), amplitude (ALH - μ m) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF - Hz), individual para cada espermatozoide analisado.

Para a análise estatística dos dados foi obtida as médias e desvio-padrão das taxas de recuperação de espermatozoides epididimários, utilizando a Análise de Variância, Programa Statistical Analysis System for Windows (SAS) e empregando o teste de Tukey no caso de diferenças significativas entre as técnicas testadas. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais deste trabalho estavam dentro dos critérios de inclusão de sanidade preconizados para este estudo, com o perfil hematológico e bioquímico dentro da normalidade para a espécie canina e negativos para os testes sorológicos de LV e brucelose.

Quanto às patologias espermáticas, os animais deste trabalho apresentaram índice elevado de anormalidades espermáticas, chegando a 74,0% de defeitos maiores e 78,6% de defeitos totais. A alteração frequentemente encontrada foi a gota citoplasmática distal (72%).

Outros estudos também observaram diferenças entre a morfologia de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo e do sêmen obtido por eletroejaculação de gatos, sendo relatada que o sêmen proveniente desta última técnica, apresentou maior porcentagem de células espermáticas com anormalidades de cauda e a gota citoplasmática distal foi o defeito morfológico frequentemente encontrado em espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo, o que provavelmente estava relacionado com o processo de maturação espermática, já que durante sua passagem pelo epidídimo é que o espermatozoide perde este resquício citoplasmático (Axnèr et al., 1998).

Conforme os resultados encontrados, observou-se que tanto as técnicas de fluxo retrógrado como de flutuação podem ser utilizadas para recuperação espermática da cauda do epidídimo de cães após a orquiectomia.

A literatura relata que a coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo através da técnica de fluxo retrógrado é a mais indicada, pois as amostras obtidas apresentam um menor nível de contaminação e apresentam melhor qualidade em relação aos outros métodos (Martinez-Pastor et al., 2006), porém, neste estudo não obteve-se diferença significativa entre as técnicas avaliadas quanto aos parâmetros de motilidade e vigor tanto no sêmen fresco como no pós-criopreservado (Tab 1.)

Tabela 1. Motilidade total e vigor espermático analisados pelas técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários de cães após orquiectomia, em sêmen fresco diluído e pós-criopreservado ($\bar{X} \pm \text{EMP}$).

Técnicas de Recuperação de Espermatozoides Epididimários	Parâmetros Analisados			
	Sêmen Fresco		Sêmen Pós-Criopreservado	
	Motilidade (N=15)	Vigor (N=15)	Motilidade (N=15)	Vigor (N=15)
	$\bar{X} \pm \text{EMP}$	$\bar{X} \pm \text{EMP}$	$\bar{X} \pm \text{EMP}$	$\bar{X} \pm \text{EMP}$
Flutuação	79,6±8,95a	3,2±0,31a	30±10,69a	2,7±0,41a
Fluxo Retrógrado	82,3±7,76a	3,4±0,33a	34±12,98a	2,8±0,51a

Letras iguais na mesma coluna não indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Em um estudo realizado com o objetivo de avaliar a qualidade seminal de cães observou-se que a motilidade de espermatozoides recuperados pela técnica de flutuação foi de 65% (Yu; Leibo, 2002) e pela técnica de fluxo retrógrado em outro estudo foi de 68% (Mota Filho et al., 2013), diferindo dos resultados encontrados neste trabalho, onde observou-se valores superiores para o sêmen fresco. Já para o parâmetro vigor espermático foram descritos valores de 3,6 na técnica de flutuação (Angrimani et al., 2014) e 3,5 na de fluxo retrógrado (Mota Filho, 2014), um pouco acima dos encontrados nestes resultados.

No Teste de Termorresistência, a partir do T30 houve influência negativa nos parâmetros de motilidade e vigor, em ambas as técnicas, com redução considerável desses valores decorridos 30 minutos pós-criopreservação (Tab. 2).

Tabela 2. Motilidade e vigor espermático do sêmen de cães orquiectomizados, avaliados por Teste de Termorresistência (TTR), nos tempos T0 a T90 minutos pós-criopreservação ($\bar{X} \pm \text{EMP}$).

Técnicas	TTR (Motilidade)				TTR (Vigor)			
	T0 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	T30 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	T60 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	T90 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	T0 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	T30 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	T60 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	T90 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$
FL	30 \pm 10,6a	20 \pm 11,1b	16,6 \pm 10,2b	8,3 \pm 10,6b	2,7 \pm 0,4a	2,2 \pm 0,77b	2 \pm 0,87b	1 \pm 1,1b
FR	34 \pm 12,9a	24,3 \pm 12,3b	16,3 \pm 10,2b	9,3 \pm 10,9b	2,8 \pm 0,5a	2,4 \pm 0,79b	2 \pm 0,92b	1 \pm 1,1b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

A ação do tempo sobre os parâmetros citados também foi observada em outro estudo, onde foram analisadas a motilidade e o vigor espermático de amostras seminais pós-criopreservadas de cães positivos e negativos para LV canina, nos tempos T0 a T60 minutos pós-criopreservação, observando-se também uma diminuição progressiva desses parâmetros (Melo Evangelista et al., 2016).

A sobrevivência dos espermatozoides após o processo de congelamento e descongelamento aparentemente depende das características principais da membrana plasmática, como composição bioquímica, resistência física, comportamento térmico e osmótico (De Leeuw et al., 1991). Porém, acredita-se que a termorresistência pós-descongelamento pode ser mais baixa para o espermatozoide canino do que para o de outras espécies e estes resultados também podem ser atribuídos à variação de congelabilidade seminal individual de cada animal (Ström et al., 1997)

Durante a avaliação do acrossoma, o tempo prejudicou a integridade destas células espermáticas também a partir do T30, diminuindo a quantidade de espermatozoides com acrossoma íntegro ao longo do tempo. Já na porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, o tempo não interferiu nestas células mesmo decorridos 90 minutos pós-criopreservação (Tab. 3 e Tab. 4).

Tabela 3. Integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides de cães orquiectomizados, avaliados por sondas fluorescentes, nos tempos T0 a T90 minutos pós-criopreservação ($\bar{X} \pm \text{EMP}$).

Técnicas	Integridade da Membrana Acrossomal			
	T0	T30	T60	T90
	(N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	(N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	(N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	(N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$
Flutuação	26,8±18,6a	18,7±14,5b	13,6±13,4b	9,2±8,5b
Fluxo Retrógrado	20,4±15,5a	14,6±13,1b	9,8±9,2b	7,7±7,8b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 4. Integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de cães orquiectomizados, avaliados por sondas fluorescentes, nos tempos T0 a T90 minutos pós-criopreservação ($\bar{X} \pm \text{EMP}$).

Técnicas	Integridade da Membrana Plasmática
----------	------------------------------------

	T0 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	T30 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	T60 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$	T90 (N=15) $\bar{X} \pm \text{EMP}$
Flutuação	33,7±17,8a	29,6±14,7a	28,2±16a	26,7±15a
Fluxo Retrógrado	32,1±19,3a	29,6±17,8a	31±21,1a	29,2±18,5a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

No entanto, em um estudo realizado após a conservação de epidídimos de cães por um período de até 72 horas na temperatura de 4°C, não observou-se alterações na integridade das membranas plasmática e acrossomal. Contudo, obtiveram queda progressiva de motilidade espermática ao longo do período de conservação nos tempos zero, 24, 48 e 72 horas (Tittarelli et al., 2006). Já em outra pesquisa com o intuito de prolongar ainda mais o tempo de conservação dos epidídimos, manteve-se os mesmos por até oito dias em temperatura de 4°C e observou-se diminuição da motilidade espermática. Em contrapartida, mesmo após o longo período de conservação, foi possível observar células com membrana plasmática intacta e com capacidade de ligação à zona pelúcida (Yu; Leibo, 2002).

Com relação à análise computadorizada do sêmen (CASA), houve diferença significativa no parâmetro seminal de motilidade progressiva (MOTP) entre as técnicas de flutuação e fluxo retrógrado (Tab. 5).

Tabela 5. Cinética de espermatozoides de cães orquiectomizados, avaliados pelo CASA pós-criopreservação ($\bar{X} \pm \text{EMP}$).

Técnicas	Parâmetros Avaliados									
	MOT	MOP	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
FL	18,1±9,4a	2,6±2,2a	50,6±10a	23,6±7,1a	30,2±6,4a	47,4±13,1a	78,5±8,5a	60,7±11,3a	2,2±1,7a	6,5±5,2a
FR	21,3±17,6a	8,3±12,2b	53,2±11a	24,2±5,2a	30,5±5,4a	46±8,2a	78,4±5,5a	58,4±7,2a	2,1±1,1a	6,9±3,9a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Legenda: MOT: motilidade total; MOP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilinear; VSL: velocidade em linha reta ou linear; VAP: velocidade média do percurso; LIN: linearidade; STR:

retilinearidade; WOB: índice de oscilação ou wobble; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide e BCF: frequência de batimento flagelar cruzado.

A técnica de FR apresentou motilidade progressiva maior quando comparada a técnica de FL, apesar de que, em ambas, esse parâmetro foi baixo. A motilidade espermática total é comumente apontada como uma das mais importantes características associadas com a habilidade fertilizante do espermatozoide (Cox et al., 2006). Apesar da avaliação da motilidade espermática não poder ser usada como uma mensuração dos espermatozoides vivos e mortos na amostra, ela fornece a informação de um fator que é necessário para a capacidade fertilizante do espermatozoide, pois a motilidade é a manifestação da sua competência estrutural e funcional (Peña-Martinez, 2004). Nestes resultados, revela-se que esse parâmetro pode interferir, de certa forma, na fertilidade dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de cães após a criopreservação.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que as técnicas de recuperação de espermática epididimária podem ser utilizadas a fresco para criopreservação de sêmen de cães recentemente castrados e na pós-criopreservação de forma imediata, porém mais estudos devem ser realizados para obtenção de novos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGRIMANI, D. S. R.; LUCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L.; SILVA, L. C. G.; REGAZZI, F. M.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa. **Andrologia**, v. 46, n. 7, p. 814-819, 2014.

AXNÉR, E.; HOLST, B. S.; LINDE-FORSBERG, C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 50, n. 6, p. 973-979, 1998.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordisk Veterinary Medicine**, v. 25, p. 383-391, 1973.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª ed., Belo Horizonte, 2013.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 860-867, 2006.

DE LEEUW, F. E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 1, p. 95-104, 1991.

GARDE J.; AGUADO, M.; PÉREZ, S.; GARRIDO, D.; PÉREZ-GUZMÁN, M.; MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 2003, 1994.

GRANEMANN, L.C. **Avaliação comparativa do sêmen eqüino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia**. 2006. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

LAGUNA, L. E. **Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades (*Cocus nucifera*) coco da praia e anão**. 1996. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1996.

LIMA, D. B. C.; SILVA, T. F. P.; AQUINO CORTEZ, A.; PINTO, J. N.; MAGALHÃES, F. F.; CALDINI, B. N.; SILVA, L. D. M. Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 873-881, 2016.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymidis of Iberian red deer. **Theriogenology**. v. 65, n. 3, p. 471-485.2006.

MARTINS, M. I. M. Perspectivas da aplicação comercial de biotecnologias envolvendo espermatozoides obtidos de epidídimo de cães e gatos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1 p. 115-118, 2007.

MELO EVANGELISTA, L. S.; CARVALHO, Y. N. T.; CASTELO BRANCO, M. A.; MOTA, L. H. C. M.; BARÇANTE, F. P. S.; SOUZA, I. O. T.; CÂMARA, T. S.; SOUZA, J. A. T. Avaliação in vitro do sêmen criopreservado de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 3, p. 651-657, 2016.

MOTA FILHO, A. C.; SILVA, L. D. M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2012.

MOTA FILHO, A. C.; SILVA, H. V. R.; FREITAS, L. A.; NUNES, T. G. P.; ARAÚJO, A. A.; SILVA, L. D. M. Refrigeração do epidídimo canino a 4°C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 33, v. 9, p. 1155-1160, 2013.

MOTA FILHO, A. C. **Conservação de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de cães**. 2014. 78f. (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2014.

PEÑA-MARTINEZ, A. I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Animal Reproduction Science**, v. 82/83, p. 209-224. 2004.

RIZZOTO, G.; MOREIRA, F.; VARELA JUNIOR, A. S.; DODE, M. E. B.; NOBRE, M. O.; CORCINI, C. D. Efeitos da adição de glicerol e etilenoglicol associados sobre parâmetros de viabilidade espermática na criopreservação de sêmen canino. **PUBVET**, v. 8, n. 22, p. 2675-2805, 2014.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

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.

TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C. A.; ARNAUDÍN, E.; STORNELLI, M. C.; STORNELLI, M. A.; SOTA, R. L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1637-1640, 2006.

YU, I.; LEIBO, S. P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1179-1190, 2002.

ANEXO I

- **Cálculo Amostral:**

Fórmula →
$$n = Z_{\alpha/2}^2 \cdot N \cdot (1-P) / \epsilon_r^2 \cdot P (N-1) + Z_{\alpha/2}^2 (1-P)$$

n: Número da Amostra

$Z_{\alpha/2}$: Nível de Confiança

P: Prevalência

ϵ_r : Erro relativo → $\epsilon_r: \epsilon/P$

N: Tamanho População

n:?

$Z_{\alpha/2}$: 1,96
0,5

$$n = (1,96)^2 \times 120 \times (1 - 0,5) / (0,1) \times 0,5 (120-1) + (1,96)^2 \times$$

P: 50% = (0,5)

n = 29,28 animais

$\epsilon_r = 0,05/05$; $\epsilon_r = 0,1$

n \approx 30 animais

N = 120 testículos

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,,
CPF nº..... tutor (proprietário) do animal,
autorizo a coleta de amostras sanguíneas para realização de teste sorológico de leishmaniose, Leptospirose e brucelose. Autorizo ainda a coleta dos testículos pós-castração para finalidade do projeto de pesquisa intitulado **“EFICIÊNCIA DE DUAS TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CÃES E AVALIAÇÃO EMINAL UTILIZANDO OS DILUIDORES TRIS-GEMA E LECITINA DE SOJA”**, que será realizado no período de Maio de 2017 a Março de 2018.

Tutor ou Responsável pelo Animal
Teresina, ____ / ____ / ____