



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

CLAUDIA DA CUNHA BARBOSA

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

FORTALEZA, CEARÁ

Dezembro, 2007

B238c

Barbosa, Claudia da Cunha.

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/ Claudia da Cunha Barbosa..? Fortaleza, 2007. 82p.; il.

Orientadora: Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva

Dissertação: (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Sêmen, 2. Cão, 3. ACP-106[®], 4. Glicerol, 5. Antibiótico. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD:636

CLAUDIA DA CUNHA BARBOSA

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva

Co-orientador: Dr. Airton Alencar de Araújo

FORTALEZA, CEARÁ

Dezembro, 2007

Universidade Estadual do Ceará

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho: 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

Autora: Claudia da Cunha Barbosa

Defesa em: 21/12/2007

Conceito obtido: _____

Nota obtida: _____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo
Universidade Estadual do Ceará
Co-Orientador

Profa. Dra. Rita de Cássia Soares Cardoso
Universidade Federal do Piauí
Examinadora

DEDICATÓRIA

A todos os que acreditaram e me acompanharam nesta jornada do mestrado. Em especial à minha mãe Arlete Inês Zago Barbosa, ao meu pai Cláudio da Cunha Barbosa, aos meus irmãos Adriano, Simone e Eduardo, ao meu grande companheiro Luiz Fernando de Lima Veloso e, a todos do Laboratório de Reprodução de Carnívoros.

HOMENAGEM

A duas pessoas fundamentais em
minha vida, meus pais **Cláudio da Cunha
Barbosa e Arlete Inês Zago Barbosa**, pelo
amor, compreensão, ensinamentos, apoio e,
principalmente, pela estrutura familiar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, presença constante em minha vida, pela proteção e força para superar os obstáculos e me ensinar a evoluir.

À minha família, meus pais Cláudio da Cunha Barbosa e Arlete Inês Zago Barbosa e, meus irmãos Adriano, Simone e Eduardo, por serem essa família maravilhosa que eu tanto amo, sempre me apoiando, incentivando e me ajudando a enfrentar as mais variadas situações.

À minha orientadora, Profa. Lúcia Daniel Machado da Silva, por ser essa pessoa maravilhosa, sempre paciente e pronta a ajudar. E ainda por ter contribuído para meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Adriana de Queiroz Pinheiro, por ter colaborado com meu aprendizado em microbiologia e, por ser uma pessoa querida, sempre disposta a ajudar.

Ao Prof. Airton Alencar de Araújo, pela paciência e ajuda com a estatística e interpretação dos resultados.

À Universidade Estadual do Ceará, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, bem como todos os professores, funcionários e alunos.

Aos Laboratórios de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino e Laboratório de Microbiologia Veterinária pela concessão no uso de equipamentos e espaço físico para a realização destes experimentos.

À ACP Biotecnologia na pessoa da Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro pelo fornecimento do diluente ACP-106[®], objeto de estudo deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos colegas do PPGCV pelo ótimo convívio e pelos bons momentos durante todo o período que estive neste programa.

Aos cães, nossos grandes amigos, por sua colaboração, e também aos seus proprietários por disponibilizarem seus animais.

Aos companheiros do Laboratório de Reprodução de Carnívoros (LRC): Janaína de Fátima Saraiva Cardoso, Carlos Gabriel de Almeida Dias, Barbara Sucupira Pereira, Cyntia Levi Baratta Monteiro, Henna Roberta Quintino, Camila Louise Ackerman, Daniel Falcão Menezes Brilhante, Áurea Helena Rocha Lima, Thiago da Silva, Leonardo Tavernezzi, Juliana Silva Araújo, Luana Azevedo de Freitas, Alberto Rocha Girão Júnior e Carla Melo Ferreira, pela ótima convivência, ajuda e momentos de alegria e descontração.

Àqueles que fizeram parte do LRC e contribuíram para meu conhecimento nesta área de reprodução de carnívoros como: Ana Kelen Felipe Lima, Raimundo Diones Carneiro, Iran Águila Maciel, Belarmino Egênio Lopes Neto.

À Ticiano Franco Pereira da Silva, Daniel Couto Uchoa, Alexandre Rodrigues Silva e Rita de Cássia Soares Cardoso, Victor Leão Hitzschky Madeira, Ricardo Parente Jucá e Ângela Cristina de Oliveira que além de grandes amigos, sempre me apoiaram e me ajudaram no que foi preciso para a realização desta dissertação.

Ao meu namorado, Luiz Fernando de Lima Veloso, pessoa que eu admiro e respeito muito pelo seu modo de ser e ver a vida. Por estar comigo nos momentos de alegria e tristeza, fazendo-me ver que eu sou capaz de vencer qualquer obstáculo. E, simplesmente, por me fazer uma pessoa feliz.

A todos os meus grandes amigos, de perto e de longe, que sempre estiveram presentes em minha vida, tanto nos momentos felizes e de festa, quanto nos momentos de maiores dificuldades e tristezas.

Sou muito grata a todos que de maneira direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

Pesquisas têm sido desenvolvidas objetivando aperfeiçoar os protocolos já existentes para a congelação de sêmen canino. Desta forma, este trabalho foi dividido em dois experimentos, tendo como objetivos: 1) comparar o efeito da temperatura de adição do glicerol (27 e 4°C) sobre o sêmen canino diluído em ACP-106[®] e criopreservado; 2) avaliar o efeito da adição de benzilpenicilina benzatina em diferentes concentrações sobre a qualidade espermática, e o controle do crescimento bacteriano no sêmen canino criopreservado em ACP-106[®]. Foram utilizados ejaculados caninos coletados por manipulação digital, os quais foram divididos e destinados aos devidos tratamentos. Para o primeiro experimento, foram formados dois grupos, sendo um o G27 (que foi glicerolizado à temperatura de 27°C) e o G4 (que foi glicerolizado a 4°C). Para o segundo, foram formados quatro grupos: G0 (diluído sem antibiótico); G500 (com 500 UI/mL); G1.000 (com 1.000 UI/mL); e G1.500 (com 1.500 UI/mL). Cada experimento foi submetido a um processamento de criopreservação, sendo o sêmen de uma maneira geral diluído, resfriado, glicerolizado (para todos os grupos do segundo experimento e o grupo G4 do primeiro experimento), envasado, congelado e armazenado em nitrogênio líquido. Após uma semana, as amostras foram descongeladas e submetidas a avaliações espermáticas e microbiológicas (experimento 2). Os ejaculados a fresco apresentaram-se dentro dos padrões requeridos para espécie, possibilitando assim sua utilização para os experimentos. No experimento 1, após a descongelação nenhuma diferença foi observada entre as temperaturas de adição do glicerol com relação aos parâmetros de motilidade avaliados pelo CASA, morfologia, integridade de acrossoma, percentual de espermatozoides vivos e teste hipoosmótico. No experimento 2, nenhuma diferença foi observada entre os grupos após descongelação com relação ao percentual de espermatozoides vivos e morfologicamente normais, e com membrana espermática funcional, com exceção do G1.500 que apresentou um aumento no número de acrossomas danificados aos 60 minutos. Na avaliação computadorizada, também não foi evidenciada diferença entre os grupos para todos os parâmetros avaliados. Não foi observada diferença entre os grupos para o número de UFC/μL após a descongelação. Concluiu-se que temperatura de adição do glicerol não influencia a qualidade pós-descongelação do sêmen canino diluído em ACP-106[®] e que a benzilpenicilina benzatina quando adicionada ao ACP-106[®] não controla o crescimento bacteriano, e não influencia a qualidade espermática após a criopreservação do sêmen canino. De uma maneira geral, verificou-se que o processamento do sêmen canino utilizando o diluidor ACP-106[®], ficou mais prático, sendo possível a realização de uma única diluição à temperatura ambiente. No entanto, ainda há necessidade de novos estudos para se verificar a ação de outros antibióticos, bem como suas interações para o controle do crescimento bacteriano, bem como seus efeitos sobre o espermatozoide canino criopreservado em ACP-106[®].

Palavras-chave: sêmen; cão; ACP-106[®]; glicerol; antibiótico

ABSTRACT

Researches have been developed aiming to improve the already existing protocols for canine semen freezing. In this way, this work was divided in two experiments, aiming: 1) to compare the effect of glycerol addition at two temperatures (27 and 4°C) on canine semen extended and frozen with powdered coconut water extender (ACP-106[®]); 2) to analyze the effect of benzylpenicillin benzatin addition in different concentrations on semen quality, and on control of bacterial growth on canine semen cryopreserved in ACP-106[®]. Canine ejaculates were collected by digital manipulation, which were divided and destined to different treatments. For the first experiment, two groups were formed, which one was G27 (that received glycerol at 27°C) and the G4 (that received glycerol an 4°C). For the second, four groups were formed: G0 (without antibiotic); G500 (extended with 500UI/mL); G1.000 (extended with 1.000UI/mL); and G1.500 (extended with 1.500UI/mL). Each experiment was submitted to one cryopreservation process, which, in generally, the semen was extended, cooled, extended with glycerol (for all groups of the second experiment and G4 of the first one), packed, frozen and stored in liquid nitrogen. After about one week, samples were thawed and submitted to spermatic and microbiology evaluations (experiment 2). Fresh ejaculates were in conformer to the pattern of canine specie, being possible to be employed for the experiments. In experiment 1, after thawing, no differences were observed between temperatures of glycerol addiction on regarding seminal motility analyzed by CASA, morphology, acrossomal integrity, hypo-osmotic swelling and alive spermatozoa. In experiment 2, no differences were observed between groups after thawing regarding the percentage of alive spermatozoa and morphological normal spermatozoa, and with functional membrane, excepted in G1.500 that presented increase on damaged acrossoma number on 60 minutes. In computerized analyzes, it was also not evidenced differences between groups for all seminal parameters. The same was observed regarding the number of UFC/ μ L after thawing. In conclusion, the glycerol temperature addition does not influence the quality of post-thawed canine semen diluted in ACP-106[®] and that benzylpenicillin benzatin when added to ACP-106[®] do not control bacterial growth and does not influence spermatic quality after canine semen cryopreservation. In general, it was observed that canine semen processed with ACP-106[®] extender become more practical, being possible to perform only one dilution at room temperature. Further more, it is still necessary to conduct new studies to verify the action of others antibiotics and theirs interactions for controlling bacterial growth, and their effects on canine spermatozoa cryopreserved in ACP-106[®].

Keywords: semen; dog; ACP-106[®]; glycerol; antibiotic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	: Porcentagem
?m/s	: Micrômetros por segundo
<	: Menor
>	: Maior
±	: Mais ou menos
=	: Menor ou igual
=	: Maior ou igual
°C	: Graus Celsius
µm	: Micrômetros
0'	: Zero minuto
60'	: Sessenta minutos
ACP - 106 [®]	: Diluente à base de água de coco em pó formulado para a espécie canina
ACP [®]	: Água de coco em pó
ANOVA	: Análise de variância
ATP	: Adenosina tri-fosfato
BCF	: Frequência de batimento da cauda
CAPES	: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CASA	: Análise de sêmen auxiliada por computador
CBRA	: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CLONE	: <i>Cryogenics Laboratory of New England</i>
cm	: Centímetro
CNPq	: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
FAVET	: Faculdade de Veterinária
FMVZ	: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FUNCAP	: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
g	: Gramas
GLM	: <i>General Linear Model</i>
L	: Litro
LRC	: Laboratório de Reprodução de Carnívoros
mL	: Mililitros
mOsm	: Miliosmol

MP	: Motilidade progressiva
MT	: Motilidade total
pH	: Potencial hidrogeniônico
SCA	: <i>Sperm Class Analyser</i>
sptz	: Espermatozóide
sptz/mL	: Espermatozóides por mililitro
TRIS	: Tris-hidroximetil-aminometano
UECE	: Universidade Estadual do Ceará
UFC	: Unidades formadoras de colônias
UFC/μL	: Unidades formadoras de colônias por microlitro
UI	: Unidades internacionais
v/v	: Volume a volume
VAP	: Velocidade média da trajetória
VCL	: Velocidade curvilínea
VSL	: Velocidade linear
μL	: Microlitro

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
REVISÃO DE LITERATURA	
Figura 1. Esquema das técnicas de diluições seriadas e contagem em placas	12
CAPÍTULO 1	
Figura 1. Análise espermática computadorizada pós-descongelção do sêmen canino criopreservado em ACP-106 [®] , submetido à glicerolização a 4°C (G4) e 27°C (G27). (A) Motilidade total (%); (B) Motilidade progressiva (%); (C) Percentual médio da sub-população de espermatozóides rápidos; (D) Percentual médio da sub-população de espermatozóides médios; (E) VAP média da sub-população de espermatozóides rápidos; (F) VAP média da sub-população de espermatozóides médios (?m/s).....	26
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Análise espermática computadorizada pós-descongelção do sêmen canino criopreservado em ACP-106 [®] , acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina. (A) Motilidade total (%); (B) Motilidade progressiva (%); (C) Percentual médio da sub-população de espermatozóides rápidos; (D) Percentual médio da sub-população de espermatozóides médios; (E) VAP média da sub-população de espermatozóides rápidos; (F) VAP média da sub-população de espermatozóides médios (?m/s).....	45

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Página

Tabela 1. Média \pm erro padrão da motilidade e do vigor à 27°C e à 4°C do sêmen canino em ACP-106 [®]	23
Tabela 2. Média \pm erro padrão da morfologia espermática e integridade de acrossoma, imediatamente após e 60 minutos após a descongelação do sêmen canino criopreservado em ACP-106 [®] , submetido à glicerolização a 4 (G4) e 27°C (G27).....	23
Tabela 3. Média \pm erro padrão do percentual de espermatozóides com membrana plasmática funcional após a descongelação do sêmen canino criopreservado em ACP-106 [®] , submetido à glicerolização a 4 (G4) e 27°C (G27).....	24

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Média \pm erro padrão da morfologia espermática, alterações de cabeça, peça intermediária, cauda, total de spz. normais e total de spz. com acrossoma intacto, imediatamente após a descongelação e após 60 minutos de incubação a 37°C, do sêmen canino criopreservado em ACP-106 [®] acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina.....	43
Tabela 2: Média \pm erro padrão do percentual de espermatozóides com membrana funcional no sêmen a fresco e após a descongelação do sêmen canino criopreservado em ACP-106 [®] acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina.....	44
Tabela 3: Média \pm erro padrão do percentual de espermatozóides vivos após a descongelação do sêmen canino criopreservado em ACP-106 [®] acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina (P<0,05).....	44
Tabela 4: Média \pm erro padrão do número de unidades formadoras de colônia por microlitros de amostra (UFC/ μ L) após a descongelação, do sêmen canino criopreservado em ACP-106 [®] acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina (P<0,05).....	44

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O espermatozóide canino.....	3
2.2. Histórico da tecnologia do sêmen canino.....	3
2.3. Componentes do meio diluído.....	4
2.4. A água de coco.....	4
2.5. Gema de ovo.....	6
2.6. Glicerol.....	6
2.7. Antibiótico.....	8
2.8. Avaliação seminal.....	10
2.8.1. Sistema de análise seminal auxiliada por computador.....	10
2.8.2. Avaliação microbiológica do sêmen.....	11
3. JUSTIFICATIVAS.....	13
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
5.1. Objetivo Geral.....	15
5.2. Objetivos Específicos.....	15
6. CAPÍTULO 1. 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 (27 e 4°C).....	16
7. CAPÍTULO 2. Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106 [®]): Efeito da adição de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina.....	32
8. CONCLUSÕES.....	51
9. PERSPECTIVAS.....	52
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53



1. INTRODUÇÃO

Ao se desenvolver técnicas para criopreservação de sêmen, objetiva-se minimizar os danos causados aos espermatozóides durante a congelação, visando um maior número de células espermáticas viáveis após a descongelação (STROM *et al.*, 1997). A congelação de sêmen canino foi descrita pela primeira vez por ROWSON (1954) e foi anunciada a primeira prenhez, resultante de uma inseminação artificial com sêmen congelado em cães por SEAGER, em 1969.

A diluição do sêmen é essencial para o sucesso da técnica de criopreservação, pois os componentes dos meios diluidores fornecem condições para a sobrevivência do espermatozóide, auxiliando na preservação da integridade da membrana plasmática, que pode sofrer alterações devido a mudanças de temperatura. O diluidor deve conter fontes energéticas para o espermatozóide, estabilizar o pH do meio, promover pressão osmótica adequada e concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos, além de prevenir o crescimento de bactérias (OLIVEIRA, 2003).

Diferentes meios diluidores têm sido testados e utilizados para a criopreservação do sêmen canino, como aqueles à base de glicina-gema, leite desnatado, tampão tris e o diluidor à base de água de coco. Além destes, muitas empresas desenvolvem seus próprios diluidores como o Triladyl, Laichipos 478, Biociphos W482 e o CLONE (OLIVEIRA, 2003).

Recentemente, um diluidor à base de água de coco foi desenvolvido na forma de pó, obtido por um processo de vaporização em *Spray Dryer* a fim de padronizar e estabilizar a água de coco. Bons resultados foram obtidos com a utilização do mesmo para inseminação artificial de cabras (SALGUEIRO *et al.*, 2002), resfriamento do sêmen eqüino (SAMPAIO NETO *et al.*, 2002), resfriamento (MADEIRA *et al.*, 2004) e criopreservação de sêmen canino (SILVA *et al.*, 2006c) e, inseminação artificial com sêmen canino a fresco e refrigerado (UCHOA *et al.*, 2004; UCHOA *et al.*, 2007).

Um componente de vital importância no diluidor é o agente crioprotetor (OLIVEIRA, 2003). O glicerol é o crioprotetor mais utilizado em várias espécies (VIDAMENT *et al.*, 2000; GIL *et al.*, 2003), inclusive a canina (SILVA *et al.*, 2003). Alguns fatores como a concentração (PEÑA *et al.*, 1998) e a forma de adição do glicerol (SILVA *et*

al., 2003) podem influenciar na criopreservação do sêmen. Dentre estes fatores, a temperatura durante a adição de glicerol gera controvérsias e é um fator que vem sendo revisado em várias espécies como ovinos (VIDAMENT *et al.*, 2000), eqüinos (GIL *et al.*, 2003) e caninos (PEÑA *et al.*, 1998). SILVA *et al.* (2005), utilizando o diluidor Tris para criopreservação do sêmen canino, não encontrou diferença entre a glicerolização a 4 ou a 27°C. No entanto, ainda não se sabe quais os efeitos da temperatura de adição de glicerol sobre o sêmen canino criopreservado em um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®).

Os antimicrobianos também podem ser adicionados nos meios diluidores com a finalidade de controlar o crescimento bacteriano no sêmen, cuja contaminação pode ocorrer no ato da coleta do sêmen por bactérias da microbiota do trato genital (LATORRE *et al.*, 1999), ou proveniente da gema de ovo (BOUSSEAU *et al.*, 1998).

A adição de antibióticos aos meios diluidores é relatada em várias espécies, sendo a associação de penicilina e estreptomicina a mais utilizada na elaboração de diluidores seminais (WATSON, 1979). Apesar de já existirem trabalhos acrescentando antibióticos ao diluidores seminais caninos (PEÑA *et al.*, 2003; SCHÄFER-SOMI *et al.*, 2006), ainda existe uma carência de informações a respeito da adição de antibióticos ao diluidor ACP-106®, bem como dos efeitos de diferentes concentrações sobre o crescimento bacteriano e a qualidade espermática do sêmen criopreservado neste diluidor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O espermatozóide canino

O espermatozóide ou gameta masculino tem como função a fertilização do gameta feminino (WATSON, 1995). É uma célula altamente diferenciada e polarizada (RODRIGUES-MARTINEZ *et al.*, 1993). O modelo básico de sua membrana plasmática segue a organização estrutural de uma bicamada de duplo folheto com fosfolipídios e proteínas associadas (WATSON, 1995).

Segundo BOUCHARD *et al.* (1990), a membrana plasmática do espermatozóide canino apresenta uma baixa proporção de ácidos graxos poli-insaturados em relação aos saturados. Essa particularidade confere ao espermatozóide canino uma resistência própria contra o choque térmico, uma vez que as células espermáticas do cão apresentam baixa sensibilidade às oscilações de temperatura.

A célula espermática canina tem um comprimento total de $61,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$. A cabeça é primariamente formada pelo DNA que compõe o núcleo, recoberta anteriormente pelo acrossoma e posteriormente pelo envoltório pós-nuclear. A cabeça mede $6,1 \pm 0,04 \mu\text{m}$ com largura de $3,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$. A peça intermediária mede $10,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$ e a cauda em torno de $50 \mu\text{m}$ (WOODALL & JOHNSTONE, 1988).

Segundo DAHLBON *et al.* (1997), existem marcadas diferenças entre indivíduos, com relação à morfometria da cabeça espermática na espécie canina.

2.2. Histórico da tecnologia do sêmen canino

SPALLANZANI, em 1776, observou que uma diminuição na temperatura proporcionava uma redução, de forma reversível, na atividade metabólica do espermatozóide, permitindo assim o seu armazenamento (ENGLAND, 1993). Após a descoberta da ação crioprotetora do glicerol por POLGE *et al.* (1949), iniciou-se um extenso desenvolvimento de metodologias de criopreservação de células espermáticas em diversas espécies, sendo o primeiro êxito na congelação de sêmen canino relatado por ROWSON (1954), e a primeira prenhez resultante de IA com a utilização de sêmen canino congelado por SEAGER (1969).

No Brasil, a primeira notificação de sucesso em inseminação artificial (IA) com sêmen canino congelado foi realizada há 25 anos, tendo sido obtida uma ninhada de seis cães normais da raça Boxer (VASKE *et al.*, 1981). Uma segunda gestação oriunda de IA com sêmen canino congelado foi confirmada por ultra-sonografia em 2000 através de um trabalho realizado pelo Laboratório de Reprodução de Carnívoros (LRC) da Universidade Estadual do Ceará (UECE - SILVA *et al.*, 2001), no entanto a cadela abortou, sendo constatada infecção por *Ehrlichia canis* e *Leishmania chagasi*.

2.3. Componentes do meio diluidor

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 e diluidor à base de água de coco na forma de pó (OLIVEIRA, 2003; CARDOSO, 2005). Além destes, muitas empresas desenvolvem seus próprios diluidores como o Triladyl, Laichipos 478, Biociphos W482 e o CLONE (OLIVEIRA, 2003).

A composição do meio diluidor é de vital importância para criopreservação do sêmen e deve ser ajustada para cada espécie. FOOTE (1964) e FOOTE e LEONARD (1964) foram os primeiros pesquisadores a investigar sistematicamente a combinação e a quantidade de vários componentes dos diluidores para a preservação do sêmen de cão.

De acordo com CONCANNON e BATTISTA (1989), o meio diluidor de sêmen deve apresentar: tampões que impeçam as mudanças nocivas de pH; substância protetora contra choque térmico durante o resfriamento; nutrientes usados como fontes de energia; prevenção no crescimento de bactérias; pressão osmótica fisiológica e concentração de eletrólitos adequada; crioprotetores para reduzir os danos da congelação.

2.4. A água de coco

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). O coco verde apresenta cerca de 400 mL de água que contém propriedades nutritivas, sendo considerada como um repositório de sais e algumas de suas aplicações terapêuticas, é a

utilização, na forma de soro oral ou intravenoso, em casos de cólera, problemas intestinais e estomacais (JAYALEKSHMY *et al.*, 1984, MACIEL *et al.*, 1992 - apud MAGALHÃES *et al.*, 2005).

A água de coco contém ainda outros compostos que mostram atividades semelhantes às das citocininas e que são derivados das purinas (difêniluréia), sendo a auxina principal o ácido 3-indol-acético (LETHAM, 1974 apud NUNES & COMBARNOUS, 1995), o qual possui atividades biológicas consideradas excelentes para as células (NUNES & SALGUEIRO, 1999).

Depois de várias pesquisas, NUNES e COMBARNOUS (1995) também isolaram 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.

Devido aos excelentes resultados obtidos com os primeiros estudos com a água de coco *in natura* na conservação, principalmente, de células espermáticas realizados pelo pesquisador *José Ferreira Nunes* durante as décadas de 80 e 90, 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) (NUNES *et al.*, 2005).

A água de coco na forma de pó (ACP[®]) foi utilizada como diluidor e obtiveram bons resultados na refrigeração do sêmen de equinos (SAMPAIO-NETO *et al.*, 2002), diluição para inseminação artificial em caprinos (SALGUEIRO *et al.*, 2002), e em cães para resfriamento (MADEIRA *et al.*, 2004), inseminação artificial com sêmen a fresco e refrigerado (UCHOA *et al.*, 2004; UCHOA *et al.*, 2007) e criopreservação do sêmen (CARDOSO *et al.*, 2005).

Outras utilizações para o ACP[®] estão em fase experimental como: meio diluente para vacinas virais animais, meio de conservação e criopreservação de órgãos para transplante, meios de cultivo de microrganismos (fungos, bactérias, vírus), protozoários e insetos, bebidas isotônicas, repositores energéticos, alimentos funcionais, produtos nutricionais para pacientes hospitalares, dentre outros (NUNES *et al.*, 2005).

2.5. Gema de ovo

A gema de ovo é o protetor de resfriamento mais utilizado para criopreservação de espermatozóides em mamíferos (MOUSSA *et al.*, 2002). Ela protege a membrana plasmática dos espermatozóides, restaurando os fosfolipídios perdidos durante os processos de congelação e descongelação (MOUSSA *et al.*, 2002). Foram PHILLIPS e LARDY (1940) que descobriram os efeitos benéficos da gema de ovo na conservação dos espermatozóides (MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2004), no entanto, seu preciso mecanismo de proteção ainda não está totalmente elucidado (MOUSSA *et al.*, 2002).

Sabe-se que a gema de ovo contém uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina, a qual interage com a estrutura lipídica da membrana plasmática dos espermatozóides, conferindo-lhes proteção durante o choque térmico (BOUCHARD *et al.*, 1990).

A maioria dos autores utiliza 20% de gema de ovo em diluidores para o sêmen do cão (PEÑA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2005), no entanto a quantidade de incorporação da gema aos diluidores varia de acordo com a capacidade tamponante dos constituintes dos mesmos, visto que a gema de ovo é um excelente tampão (FARSTAD, 1996).

SILVA *et al.* (2006c), utilizando o diluidor ACP-106[®] acrescido de 20% de gema de ovo de galinha para criopreservação do sêmen canino, observaram após a descongelação uma motilidade de 51,5% e vigor de 3,9. CARDOSO (2005) utilizando este mesmo diluidor observou que a gema de ovo altera a viscosidade no diluidor e forma grumos, dificultando a avaliação computadorizada da motilidade espermática.

Um outro ponto negativo é o fato da gema de ovo ser de origem biológica e poder contaminar os diluidores, sendo uma fonte potencial de transmissão de doenças, criando assim, um obstáculo para a comercialização de sêmen entre países (BOUSSEAU *et al.*, 1998).

2.6. Glicerol

Nos meios de diluição para a criopreservação de sêmen, faz-se necessário o uso de substâncias crioprotetoras que protejam a célula espermática dos danos causados durante o equilíbrio, congelação e descongelação (CONCANNON & BATTISTA, 1989). Esses agentes

pertencem a dois grupos: aqueles que penetram nas células como o glicerol, o dimetil sulfóxido (DMSO) e o metanol; aqueles que permanecem no meio extracelular como as proteínas, os açúcares e o polivinil pirrolidona (ENGLAND, 1993).

Desde que POLGE *et al.* (1949) demonstraram a eficácia do glicerol, ele foi considerado o crioprotetor universal, sendo a substância mais amplamente empregada na congelação de sêmen, incluindo a espécie canina (ENGLAND & ALLEN, 1992).

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$) é um álcool polihídrico altamente permeável (STOREY *et al.*, 1996) e, apesar da sua larga utilização, seu mecanismo no interior da célula não está totalmente elucidado (CURRY, 2000). Sabe-se que sua habilidade em transpor a membrana celular permite a desidratação da célula através da saída de água por osmose, evitando assim a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (MEDEIROS *et al.*, 2002).

A ação protetora destes crioprotetores é atribuída a suas propriedades coligativas e ligantes com a água, diminuindo o ponto crioscópico intracelular e, portanto, aumentando a quantidade de água que permanece no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos e reduzindo os danos do efeito solução (PEÑA, 1997; HOLT, 2000).

A concentração ótima de glicerol varia de acordo com o diluidor, método de congelação e a espécie animal. Para a congelação do sêmen do cão, as concentrações têm variado de 4 a 11% (v/v), dependendo da composição do diluidor e do tampão utilizado. A concentração ótima de glicerol deve permitir uma superioridade dos seus efeitos protetores sobre os seus efeitos tóxicos (WATSON, 1979). TERHAER (1993) afirma ser o espermatozóide canino bastante tolerante ao glicerol (apud RODRIGUES, 1997), contudo, altas concentrações do mesmo podem afetar a capacidade fertilizante do espermatozóide (NEVILLE *et al.*, 1970).

SILVA *et al.* (2003), utilizando o diluidor TRIS-gema, verificaram que o glicerol pode ser adicionado de forma única ao sêmen, sem comprometimento da morfologia do espermatozóide pós-descongelação.

A temperatura durante a adição do glicerol gera controvérsias e vem sendo revisado em várias espécies como ovinos (GIL *et al.*, 2003), eqüinos (VIDAMENT *et al.*, 2000) e caninos (PEÑA *et al.*, 1998). Sabe-se que os agentes crioprotetores intracelulares, particularmente o glicerol, exercem seu maior papel de crioproteção durante a cristalização (-6° e -10°C).

Em cães, alguns autores realizam a adição do glicerol após o resfriamento a 4°C (CARDOSO *et al.*, 2006), outros em temperaturas mais altas como a 32°C (YILDITZ *et al.*, 2000), 35°C (NÖTHLING & SHUTTLEWORTH, 2005) e temperatura ambiente (ROTA *et al.*, 1996). SILVA *et al.* (2005) não encontraram diferenças entre a adição de glicerol ao sêmen a 27° ou a 4°C, utilizando o diluidor TRIS-gema, e ANDERSEN (1975) notificou a adição de um diluidor glicerolizado ao sêmen a 37°C e obteve bons resultados após a inseminação artificial.

Foi observado que a temperatura de adição do glicerol (37 ou 4°C) não afetou a motilidade espermática, percentual de espermatozóides vivos e com acrossoma íntegro (PEÑA *et al.*, 1998), possibilitando assim a realização da glicerolização a temperatura ambiente a fim de se proporcionar praticidade ao protocolo de criopervação, utilizando o diluidor TRIS.

Apesar destes vários trabalhos, ainda não se sabe qual o efeito da temperatura de adição do glicerol sobre o sêmen canino, utilizando um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®).

2.7. Antibiótico

Apesar dos ejaculados serem estéreis, estes se contaminam durante o processo de colheita na sua passagem pela uretra, pênis e prepúcio. No entanto, esta contaminação pode ser reduzida, através do uso de técnicas assépticas e medidas de higiene antes e durante a coleta (WATSON, 1990).

Outras potenciais fontes de contaminação do sêmen são a gema de ovo de galinha, utilizada nos diluidores (BOUSSEAU *et al.*, 1998), o próprio diluidor, as palhetas, o álcool

polivinílico (MARINOV & BOHNEL, 1972), bem como o nitrogênio líquido e sua fase de vapor (LEVY *et al.*, 2004).

Desta forma, o controle do crescimento bacteriano no sêmen, através da incorporação de antimicrobianos nos diluidores de sêmen, pode ser de grande importância, uma vez que a contaminação seminal por bactérias pode afetar negativamente a fertilidade pela própria presença das mesmas, pela produção de suas toxinas e por degradação dos componentes do meio (WATSON, 1990).

Vários antimicrobianos vêm sendo acrescentados aos diluidores para criopreservação do sêmen de bovinos (MOUSSA *et al.*, 2002), eqüinos (VIDAMENT *et al.*, 2000), suínos (KAWANO *et al.*, 2004) e caninos (PEÑA *et al.*, 2003), sendo as principais classes farmacológicas testadas os β -lactâmicos, os aminoglicosídeos (BOUSSEAU *et al.*, 1998; HUYSER *et al.*, 2004; GARY & LU, 2005) e os macrolídeos (BOUSSEAU *et al.*, 1998; VARNER *et al.*, 1998; HUYSER *et al.*, 2004; GARY & LU, 2005).

Os antibióticos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, fosfomicinas) interferem no processo de síntese da membrana celular bacteriana, causando lise e morte celular (ANDRADE *et al.*, 2002). Já os aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) e os macrolídeos (lincomicina, eritromicina), são inibidores da síntese protéica bacteriana (ANDRADE *et al.*, 2002).

Segundo WATSON (1979) a associação clássica de penicilina e estreptomicina resulta numa preparação antibiótica eficaz e, possivelmente, a mais utilizada na elaboração de diluidores seminais. Foi relatado o uso dessa associação para refrigeração de sêmen canino com o diluidor Tris e posterior inseminação e nascimento de crias saudáveis (SILVA *et al.*, 2004).

LATORRE *et al.*, (1999) realizaram um estudo da flora bacteriana de dezesseis cães, sendo realizados isolamentos e testes de sensibilidade antimicrobiana. Das 47 amostras foram isoladas: *Staphylococcus coagulase negativo*, *Pasteurella sp*, *Pseudomonas sp*, e *Escherichia coli*, com 100% de sensibilidade para clorafenicol, enrofloxacina, florfenicol, imipenem e sulfazotrin e 87,50% de resistência ao ácido nalidíxico.

São poucos os estudos avaliando os efeitos dos antibióticos sobre a qualidade espermática. Foi verificado que para o sêmen equino refrigerado, a adição de amicacina, gentamicina, estreptomicina, penicilina potássica e sódica, ticarcilina, e polimixina B, ao diluidor, não interferem na motilidade espermática (VARNER *et al.*, 1998), no entanto doses elevadas de antimicrobianos podem prejudicar a motilidade e a membrana acrossômica, quando o sêmen equino é preservado a 4°C por até 72 horas (VIEIRA *et al.*, 2002).

Apesar da utilização de antibióticos em diluidores seminais, ainda há uma carência de informações a respeito de seus efeitos, bem como da concentração ideal destes, para serem adicionados ao diluidor ACP-106[®] para criopreservação do sêmen canino.

2.8. Avaliação seminal

2.8.1. Sistema de análise seminal auxiliada por computador

Até recentemente, análises seminais em muitas espécies de mamíferos eram baseadas em uma avaliação subjetiva de parâmetros como motilidade, vigor e concentração espermática. Porém, esse método pode apresentar resultados errados e conflitantes, pois podem ser influenciados pela temperatura do ambiente e pela habilidade do avaliador. Desta forma, no intuito de se padronizar e objetivar essas avaliações, tanto para fins clínicos, quanto de pesquisa, foram criados aparelhos de mensuração computadorizada (DOTT & FOSTER, 1979).

O sistema de análise seminal auxiliada por computador (CASA) foi inicialmente proposto por DOTT & FOSTER, (1979), sendo sua primeira descrição para a análise seminal do cão relatada por GÜNZEL-APEL *et al.* (1993), e atualmente utilizada por diversos pesquisadores (RIJSSELAERE *et al.*, 2003, ROTA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006b).

O CASA é uma técnica acurada, que se baseia na avaliação individual do espermatozóide, calculando de forma rápida diferentes parâmetros como a motilidade total, motilidade progressiva, linearidade e vários parâmetros de velocidade como a velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP) e velocidade linear (VSL) (RIJSSELAERE *et al.*, 2003; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

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

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

2.8.2. Avaliação microbiológica do sêmen

Para a avaliação microbiológica do sêmen, podem ser utilizadas técnicas quantitativas, como a técnica de contagem em placas e qualitativas, como o isolamento bacteriano e, ainda, o teste de sensibilidade antimicrobiana (TORTORA, *et al.*, 2005).

A técnica de contagem em placas é utilizada para determinação o tamanho de uma população bacteriana presente em uma amostra (TORTORA, *et al.*, 2005) e consiste no plaqueamento de alíquotas de amostras a serem avaliadas e sua distribuição em meios de cultura sólidos adequadamente selecionados em função do(s) microorganismo(s) a ser(em) enumerado(s) (FRANCO & LANDGRAF, 1996). O plaqueamento pode ser feito por semeadura na superfície do meio de cultura previamente distribuído em placas de Petri estéreis (semeadura de superfície), ou então, o meio de cultura pode ser adicionado após a transferência das alíquotas para placas de Petri vazias (semeadura em profundidade).

Após a semeadura, as placas são incubadas a uma combinação de temperatura e tempo adequada para cada tipo de amostra. A contagem pode ser realizada manualmente ou com auxílio de contadores automáticos (FRANCO & LANDGRAF, 1996), sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônia, visto que cada colônia é resultado não de uma única bactéria, mas de uma cadeia ou de um grupo de bactérias (TORTORA, *et al.*, 2005).

A técnica de contagem em placas pode ser antecedida pela técnica de diluição seriada, principalmente quando a amostra coletada não é estéril e pode apresentar microbiota

rica, fato que leva ao crescimento de muitas colônias em uma única placa, impossibilitando sua contagem (TORTORA, *et al.*, 2005).

A técnica de diluição seriada consiste na realização de diluições seriadas de uma amostra em tubos contendo caldo de cultura apropriado para cada tipo de análise. Em seguida, é retirada uma alíquota de cada tubo, contendo o caldo e a amostra diluída, esta é inoculada em placas de Petri, sendo utilizada então a técnica de contagem em placas (TORTORA, *et al.*, 2005).

As técnicas de contagem em placas e diluição seriada foram (Figura 1) utilizadas em trabalhos com sêmen suíno a fresco (TONIOLLI *et al.*, 2001), sêmen bovino a fresco (GENOVEZ, *et al.*, 1999) e criopreservado (GENOVEZ, *et al.*, 1999; VISSER *et al.*, 1999), e sêmen fresco e criopreservado de caprinos (SOUZA, *et al.*, 2006), não tendo ainda sido utilizadas para o sêmen canino.

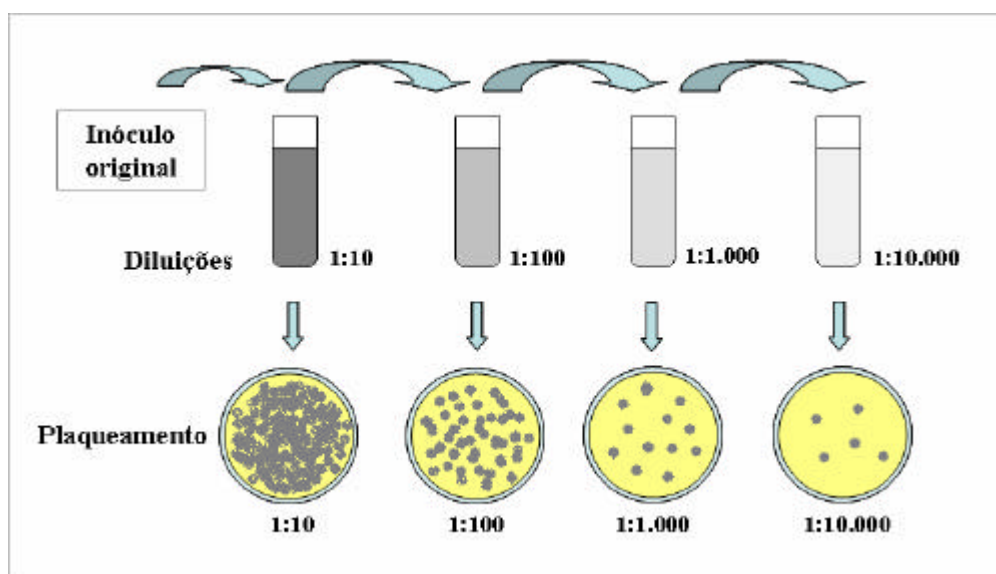


Figura1: Esquema das técnicas de diluições seriadas e contagem em placas.

Fonte: TORTORA *et al.*, 2005 (Modificado).

3. JUSTIFICATIVA

Vários diluidores já foram utilizados com sucesso na criopreservação de sêmen canino. Dentre eles podemos destacar o diluidor à base de água de coco na forma de pó, que foi desenvolvido com o objetivo da padronização do diluidor a base de água de coco para uma futura comercialização.

O ACP[®] já foi utilizado com sucesso para o resfriamento e criopreservação de sêmen de cão, onde para o resfriamento pôde-se conservar o sêmen por até 96 horas a 4 °C (MADEIRA *et al.*, 2004) e, no caso da criopreservação, obteve-se aproximadamente 60% de espermatozóides móveis após a descongelação (CARDOSO *et al.*, 2004). No entanto, estudos são necessários para aperfeiçoar o protocolo de criopreservação, visto que ainda não se sabe o efeito da temperatura de adição do diluidor glicerolizado ao sêmen, sob a qualidade espermática, bem como não se sabe o efeito da adição de diferentes concentrações de antibióticos sobre o crescimento microbiano e, qualidade espermática do sêmen canino criopreservado em um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106[®]). Desta forma, o aperfeiçoamento do protocolo de congelação de sêmen canino com ACP-106[®] poderá permitir o seu uso em escala comercial, uma vez que é crescente o número de criadores comerciais de cães interessados no armazenamento e subsequente difusão de material genético de seus animais.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

✍ A adição do ACP-106[®] com glicerol ao sêmen canino à temperatura de 27°C confere resultados pós-descongelção semelhante aos obtidos após a glicerolização a 4°C

✍ A benzilpenicilina benzatina quando adicionada ao diluidor ACP-106[®] controla o crescimento bacteriano, sem causar danos ao espermatozóide canino.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

✍ Avaliar uma nova forma de glicerolização, bem como a adição de antibióticos ao diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106[®]), verificando seus efeitos sobre a qualidade do sêmen canino congelado-descongelado.

5.2. Objetivos Específicos

✍ Verificar o efeito da adição de diluidor glicerolizado ao sêmen, em diferentes temperaturas, sobre a motilidade, percentuais de espermatozóides vivos, morfologia, e integridade funcional de membrana do espermatozóide canino criopreservado, utilizando o diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106[®]).

✍ Avaliar o efeito da adição de benzilpenicilina benzatina em diferentes concentrações sobre a motilidade, percentuais de espermatozóides vivos, morfologia, e integridade funcional de membrana do espermatozóide canino criopreservado, utilizando o diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106[®]).

✍ Verificar a ação da benzilpenicilina benzatina em diferentes concentrações em um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106[®]) sobre o controle do crescimento bacteriano.

6. CAPÍTULO 1

Artigo 1

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 (27 e 4°C)

Claudia da Cunha Barbosa, Victor Leão Hitzschky Madeira, Ricardo Parente Jucá, Ângela Cristina de Oliveira, Daniel Couto Uchoa, Lúcia Daniel Machado da Silva

Artigo submetido em 12 de novembro de 2007 ao periódico “Ciência Animal Brasileira”, classificada como QUALIS A nacional.

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 (27 e 4°C)

Cryopreservation of canine semen using a powdered coconut water extender (ACP-106[®]):
Effect of glycerol temperature addition (27 and 4°C)

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi comparar o efeito da temperatura de adição do glicerol (27 e 4°C) sobre o sêmen canino diluído em ACP-106[®] e criopreservado. Doze ejaculados provenientes de seis cães foram coletados por manipulação digital. A fração espermática foi avaliada e dividida em duas alíquotas. A primeira alíquota foi diluída em ACP-106[®] com 5% de gema de ovo e glicerol a 27°C (G27) e a segunda diluída em ACP-106[®] com 5% de gema de ovo, porém a glicerolização ocorreu a 4°C. As amostras foram congeladas e estocadas em nitrogênio líquido. Aproximadamente de uma semana, amostras foram descongeladas e submetidas à avaliações de morfologia, integridade acrossomal, teste hipo-osmótico e percentual de vivos. Nenhuma diferença foi observada entre as temperaturas de adição do glicerol com relação aos parâmetros seminais avaliados. Na análise computadorizada, também não foi evidenciada diferença entre os grupos para todos os parâmetros avaliados, sendo observada em G4 e G27, respectivamente, uma motilidade total de $24,45 \pm 3,93\%$ e $31,65 \pm 3,87\%$ e a velocidade média da trajetória (VAP) dos espermatozoides rápidos de $91,24 \pm 7,74\mu\text{m/s}$ e $106,25 \pm 3,94\mu\text{m/s}$. Conclui-se que a temperatura de adição do glicerol não influencia a qualidade pós-descongelção do sêmen canino diluído em ACP-106[®].

Palavras chaves: criopreservação; sêmen; cão; glicerol; ACP-106[®]

SUMMARY

The aim of the present study was to compare the effect of glycerol addition at two temperatures (27 and 4°C) on canine semen extended and frozen with powdered coconut water extender (ACP-106[®]). Twelve ejaculates from six stud dogs were collected by digital manipulation. The sperm-rich fraction was evaluated and further divided into two aliquots. The first aliquot was extended in ACP-106[®] with 5% egg yolk and glycerol at 27°C (G27) and

the second one was also extended in ACP-106[®] with 5% egg yolk, but received glycerol at 4°C (G4). Samples were frozen and stored in liquid nitrogen. After about one week, samples were thawed and submitted to evaluations of morphology, acrossomal integrity, hypo-osmotic swelling and alive spermatozoa. No differences were observed between groups after thawing regarding seminal parameters evaluated. In computerized analyzes, it was also not evidenced differences between groups for all parameters evaluated, being observed in G4 and G27, respectively, a total motility of $24.45 \pm 3.87\%$ and $31.65 \pm 3.93\%$, with the velocity average pathway VAP of the rapid spermatozoa of $91.24 \pm 7.74 \mu\text{m/s}$ and $106.25 \pm 3.94 \mu\text{m/s}$. In conclusion, the glycerol temperature addition does not influence the quality of post-thawed canine semen diluted in ACP-106[®].

Key Words: semen; dog; glycerol; ACP-106[®]

INTRODUÇÃO

Um componente de vital importância no diluidor para criopreservação de sêmen é o agente crioprotetor (OLIVEIRA, 2003), sendo o glicerol o mais utilizado em várias espécies (VIDAMENT et al., 2000; GIL et al., 2003), inclusive a canina (SILVA et al., 2003).

O glicerol pertence ao grupo dos crioprotetores intracelulares e ao penetrar na célula, promove sua desidratação através da saída de água por osmose, evitando assim a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (MEDEIROS et al., 2002). Sua ação protetora é atribuída às suas propriedades coligativas e ligantes com a água, diminuindo o ponto crioscópico intracelular e a concentração intracelular de solutos, reduzindo os danos do efeito de solução (HOLT, 2000).

Fatores como a concentração (PEÑA et al., 1998) e forma de adição do glicerol (SILVA et al., 2003) podem influenciar a criopreservação do sêmen. Segundo PEÑA et al. (1998), a concentração ótima de glicerol varia de acordo com o diluidor, método de congelamento e a espécie animal. CARDOSO et al. (2003a), utilizando o diluidor à base de água de coco, demonstraram que as concentrações de 4, 6 e 8% de glicerol poderiam ser utilizadas para a criopreservação do sêmen canino.

A temperatura de adição do glicerol gera controvérsias e vem sendo revisada em várias espécies como ovinos (GIL et al., 2003), eqüinos (VIDAMENT et al., 2000) e caninos (PEÑA et al., 1998). Para o sêmen canino, alguns autores realizam a adição do glicerol em temperaturas como a 32°C (YILDTZ et al., 2000), 35°C (NÖTHLING &

SHUTTLEWORTH, 2005), temperatura ambiente (ROTA et al., 1996) e ainda a 4°C (CARDOSO et al., 2005). SILVA et al. (2005) não encontraram diferenças entre a adição de glicerol ao sêmen canino a 27° ou a 4°C, utilizando o diluidor TRIS-gema e ANDERSEN (1975) notificou a adição de um diluidor glicerolizado ao sêmen a 37°C e obteve bons resultados após a inseminação artificial.

Visto o grande número de trabalhos utilizando variadas temperaturas de glicerolização, sem interferência na qualidade espermática e, a carência de estudos sobre a temperatura de adição do glicerol ao diluidor ACP-106[®] para a criopreservação de sêmen canino, o trabalho teve como objetivo comparar o efeito da adição do glicerol a 27 e 4°C sobre o sêmen canino diluído em ACP-106[®] e criopreservado, utilizando os parâmetros de motilidade pós-descongelação, morfologia, integridade acrossomal, percentual de espermatozóides vivos, teste de termorresistência e hipoosmótico.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram selecionados seis cães, oriundos de canis particulares, sendo dois da raça Boxer, dois Rottweiler, um American Pit Bull Terrier e um Bullmastiff, com idade entre 18 meses e 9 anos. Os cães foram mantidos em canis individuais com livre acesso a água e alimentados uma vez ao dia com ração comercial.

Coleta e avaliação de sêmen

Foi utilizado um total de 12 ejaculados, sendo 6 obtidos da raça Boxer, 4 da raça Rottweiler, um da raça American Pit Bull Terrier e um da raça Bullmastiff. A coleta foi realizada através da técnica de manipulação digital (CHRISTIANSEN, 1988), utilizando-se tubos de vidro graduados acoplados a um funil, sendo as frações seminais separadas por mudança na coloração. A fração rica em espermatozóides foi destinada a avaliações e posterior criopreservação. No sêmen a fresco, foram observados os parâmetros macroscópicos de cor e volume. Os parâmetros microscópicos de motilidade (percentual de espermatozóides com motilidade progressiva e retilínea) e vigor espermático, mensurado em uma escala de 0 (ausência de movimento) a 5 (movimento vigoroso, retilíneo e progressivo; CBRA, 1998) foram avaliados com auxílio de microscópio óptico (100x).

A morfologia espermática e a integridade acrossomal foram avaliadas através da contagem de 200 células em esfregaço úmido corado com rosa de bengala, sendo as células classificadas como normal ou apresentando alterações primárias ou secundárias, e separadas de acordo com a sua localização (cabeça, peça intermediária e cauda). O acrossoma foi classificado como intacto ou danificado. Estas avaliações foram realizadas em microscopia de luz, em aumento de 1000x.

A concentração espermática foi mensurada por meio de contagem em câmara de Neubauer (CARDOSO et al., 2003b).

Somente amostras apresentando motilidade = 85%, vigor = 4 e alterações morfológicas totais espermáticas = 15%, foram utilizadas para o experimento.

Processamento do sêmen

A água de coco na forma de pó (ACP-106[®], ACP BIOTECNOLOGIA[®], Fortaleza-Ceará, Brasil), foi utilizado como diluidor base, preparado segundo recomendações do fabricante com um pH de 7,07 e osmolaridade de 298mOsm. A este diluidor foi acrescida gema de ovo, com uma concentração final de 5%. O diluidor já com a gema de ovo foi dividido em duas partes (A e B).

A parte “A” composta por ACP-106[®] + gema de ovo e a Parte “B”, similar à anterior, entretanto acrescida de glicerol em uma concentração final de 12% .

Após a avaliação inicial do sêmen, este foi dividido em duas alíquotas, e destinado a dois grupos experimentais: grupo 27 (G27) e grupo 4 (G4).

No grupo 27, foi diluído com ACP-106[®], gema de ovo e glicerol, de forma única à temperatura de 27°C. O grupo 4 foi diluído com ½ parte do diluidor A, necessário para atingir uma concentração final de 200×10^6 espermatozóides/mL, designado como G4. Após esta primeira diluição, ambos os grupos armazenados em tubos de vidro foram colocados em um recipiente com água e acondicionados em caixa térmica com gelo reciclável (15°C) por 40 minutos. Em seguida, os grupos foram transferidos para um refrigerador até atingir 4°C (30 minutos).

A segunda diluição foi realizada somente no G4, diluindo-o de forma única com a outra ½ parte do diluidor B, sendo o glicerol adicionado a esta amostra à temperatura de 4°C. Após 15 minutos desta segunda diluição, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, sendo dispostas horizontalmente em rampa de congelação a uma altura de 5 cm do nível de nitrogênio líquido por cinco minutos e, finalmente, armazenadas em nitrogênio líquido.

Durante o processamento, foram realizadas duas avaliações da motilidade e do vigor das amostras, sendo uma a 27°C após a diluição e, a segunda após o resfriamento e diluição do G4 a 4°C, vale ressaltar que as avaliações foram realizadas em ambos os grupos em cada tempo.

Teste de termorresistência e análise da motilidade espermática auxiliada por computador

Após cerca de uma semana, o sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 1 minuto, depositado em um tubo Eppendorf® e destinado ao teste de termorresistência. Neste teste, o sêmen foi mantido em banho-maria a 37°C, avaliado imediatamente e 30, 60 e 90 minutos após a descongelação, a fim de se verificar a termorresistência espermática (SILVA *et al.*, 2003).

Após a descongelação e com 60 minutos de incubação em banho-maria, foi realizada a avaliação do percentual de espermatozóides vivos, através de esfregaços de sêmen corados com azul de bromofenol. Foram contadas 100 células com auxílio de microscópio de luz com aumento de 400x, sendo classificados como vivos os espermatozóides que não estavam corados. Nestes dois tempos de incubação também foram avaliadas a morfologia espermática e integridade do acrossoma, com lâminas coradas com rosa de bengala.

Foi realizada ainda a análise computadorizada da motilidade espermática, com auxílio de um microscópio de contraste de fases acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema *Sperm Class Analyser*® (SCA, Microptic S.L., versão 3.2.0).

Para a análise computadorizada, foi realizada uma re-diluição da amostra, sendo 10 µl da amostra homogeneizada em um segundo tubo Eppendorf®, contendo 50 µl de uma solução de citrato de sódio-glicose a 37°C (2,37 g citrato de sódio, 0,80 g glicose, 100 mL água destilada), a fim de se atingir uma concentração de 20 a 50x10⁶ de spz/mL. Cinco µl da amostra re-diluída foi colocada em uma Câmara de Makler® (Sel-Medical Instruments), previamente aquecida a 37°C, sendo avaliados então os parâmetros de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade média da trajetória do espermatozóide (VAP, µm/s) e % de sub-populações de espermatozóides com velocidade média (VAP 55 a 95 µm/s) e rápida (VAP > 95 µm/s).

Teste hipoosmótico

O teste hipoosmótico foi realizado após a coleta, e imediatamente após a descongelação do sêmen. Para isso 0,01 mL de sêmen foi diluído em 0,09 mL de água

destilada (solução hipoosmótica) e mantido em banho-maria a 38°C por 45 minutos. Após este período, uma alíquota espermática foi colocada em uma lâmina de vidro, coberta com lamínula, sendo contadas 200 células com auxílio de microscópio ótico com aumento de 400x. A membrana espermática foi considerada funcional quando os espermatozóides apresentavam sua cauda enrolada (SPITTALER & TYLER, 1985).

Análise estatística

Os dados foram expressos na forma de média e erro padrão e analisados pelo programa *Systat 7.0* (SPSS Inc. 1997). Dados percentuais sofreram transformação angular em arco-seno. ANOVA-GLM (*General Linear Model*) foi utilizada para verificar as diferenças estatísticas entre os grupos e os tempos de avaliação. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey para se verificar a interação do efeito da temperatura de adição do glicerol e do tempo de incubação. Para todas as análises utilizou-se $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração espermática do sêmen a fresco apresentou características dentro dos padrões normais para a espécie canina (CBRA, 1998), com uma coloração branca opalescente; volume de $1,39 \pm 0,26$ mL; pH $6,04 \pm 0,08$; concentração espermática de $960 \pm 150,86 \times 10^6$ spz/mL; motilidade de $99,17 \pm 0,56\%$; vigor 5 ± 0 ; $94,64 \pm 0,73\%$ de espermatozóides normais e $99,36 \pm 0,25\%$ de acrossoma intacto.

Durante o processamento do sêmen, foi observado que a temperatura de 27°C o G27 apresentou motilidade ($99,58 \pm 0,42\%$) e vigor (5 ± 0) superior ao G4 ($92,92 \pm 2,34\%$ e $4,37 \pm 0,20$) ($P < 0,05$), não sendo observada esta diferença à 4°C (Tabela 1). Quando avaliado de forma isolada, G4 manteve seus padrões de motilidade e de vigor, enquanto que no G27 foi observada uma redução, tanto da motilidade, quanto do vigor após a avaliação a 4°C ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Apesar da redução na motilidade observada no G27 após o resfriamento, o sêmen foi considerado como apresentando uma boa qualidade, visto que esta queda na motilidade também foi relatada por CARDOSO et al. (2005) e SILVA et al. (2001), utilizando diluidores à base de água de coco e Tris, respectivamente. A queda na motilidade após o resfriamento deve ter sido ocasionada provavelmente pelo choque térmico que causa mudanças na organização e permeabilidade da membrana espermática (WATSON, 1981).

Tabela 1. Média \pm erro padrão da motilidade e do vigor à 27°C e à 4°C do sêmen canino em ACP-106®.

Grupos	Diluição	Motilidade	Vigor
G4	4°C	92,92 \pm 2,34 ^{aA}	4,37 \pm 0,20 ^{aA}
	27°C	92,25 \pm 1,02 ^{aA}	4,46 \pm 0,17 ^{aA}
G27	4°C	99,58 \pm 0,42 ^{aB}	5 \pm 0 ^{aB}
	27°C	88,50 \pm 4,03 ^{bA}	4,50 \pm 0,20 ^{bA}

^{a,b} Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as diluições do mesmo grupo.

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos na mesma diluição.

(P < 0,05).

Tabela 2. Média \pm erro padrão da morfologia espermática e integridade de acrossoma, imediatamente após e 60 minutos após a descongelação do sêmen canino criopreservado em ACP-106®, submetido à glicerolização a 4 (G4) e 27°C (G27).

%	Sêmen descongelado			
	G4		G27	
	0'	60'	0'	60'
Alterações de cabeça				
Primárias	0,29 \pm 0,13	0,21 \pm 0,10	0,25 \pm 0,13	0,21 \pm 0,11
Secundárias	0,71 \pm 0,71	0,58 \pm 0,25	0,46 \pm 0,19	0,42 \pm 0,25
Alterações de peça int.				
Primárias	0,21 \pm 0,11	0,83 \pm 0,06	0,08 \pm 0,08	0,12 \pm 0,12
Secundárias	1,83 \pm 0,44	1,75 \pm 0,45	1,92 \pm 0,58	1,46 \pm 0,45
Alterações de cauda				
Primárias	0,17 \pm 0,09	0,42 \pm 0,29	0,04 \pm 0,04	0,12 \pm 0,06
Secundárias	4,17 \pm 0,57	5,87 \pm 0,99	5,75 \pm 0,82	5,96 \pm 0,72
Total sptz. normais	92,75 \pm 0,85	91,08 \pm 0,81	91,58 \pm 1,22	91,71 \pm 1,05
Acrossoma intacto	94,87 \pm 0,73	94,87 \pm 0,55	95,71 \pm 0,62	95,12 \pm 0,59

P > 0,05.

Peça int.: peça intermediária; sptz.: espermatozóide; 0': zero minuto; 60': sessenta minutos.

Após a descongelamento, foi observado que os padrões de morfologia e integridade de acrossoma não sofreram influência da temperatura de adição do glicerol, bem como não foi observada redução nesses parâmetros com o passar do tempo de incubação no teste de termorresistência ($P > 0,05$). Os resultados de morfologia espermática e integridade de acrossoma estão ilustrados na Tabela 2 e estão de acordo com os resultados obtidos por SILVA et al. (2005) em que os mesmos não encontraram diferença na morfologia espermática, bem como na integridade acrossomal entre as temperaturas de glicerolização em ambos os tempos de incubação.

Durante o processo de resfriamento, criopreservação e descongelamento, ocorrem alterações químicas e físicas na membrana celular, que levam à ruptura e remoção de importantes proteínas de membrana, alterações na estrutura da bi-camada lipídica e lipoprotéica da membrana plasmática, redução da fluidez, aumento da permeabilidade, danos no acrossoma, desidratação, liberação de enzimas e fosfolipídios, redução da atividade metabólica, diminuição do consumo de ATP, que podem comprometer de forma parcial ou total a fertilidade (FARSTAD, 1996; HOLT, 2000) e, ainda, reduzir a longevidade espermática e acelerar a capacitação (WATSON, 1995).

No presente trabalho, pôde-se notar que a integridade de membrana foi afetada pelo processo de criopreservação, visto que no sêmen a fresco o percentual de espermatozoides com membrana funcional foi de $89,75 \pm 2,82\%$, sendo observada uma redução significativa neste número após a descongelamento em G4 e G27 (Tabela 3), não diferindo entre eles após a descongelamento ($P > 0,05$). Os valores obtidos neste trabalho são semelhantes aos de ROTA et al. (2006), o qual utilizou dois observadores para verificar o percentual de espermatozoides com membrana funcional, obtendo $59 \pm 6,2\%$ e $71 \pm 4,5\%$. Esta redução no percentual de espermatozoides com membrana funcional provavelmente se deve às grandes alterações e danos ocorridos nas membranas espermáticas durante o processo de congelamento e descongelamento conforme relatados por WATSON (1995).

Tabela 3. Média \pm erro padrão do percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional após a descongelamento do sêmen canino criopreservado em ACP-106[®], submetido à glicerolização a 4 (G4) e 27°C (G27).

Sêmen fresco (%)	Descongelado (%)	
	G4	G27
$89,75 \pm 2,82^a$	$65,33 \pm 6,41^b$	$67,33 \pm 7,50^b$

^{a,b} Letras minúsculas diferentes indicam diferença na linha entre os grupos ($P < 0,05$).

A viabilidade espermática pós-descongelamento não diferiu entre os grupos testados, sendo observado respectivamente em G4 e G27, $27,25 \pm 3,79\%$ e $32,42 \pm 4,13\%$ de espermatozoides vivos ($P > 0,05$). No entanto, após 60 minutos de incubação no teste de termorresistência, foi observada uma redução no percentual de espermatozoides vivos para ambos os grupos, $9,83 \pm 2,52\%$ (G4) e $12,75 \pm 2,67\%$ (G27) ($P < 0,05$), não diferindo entre si neste momento ($P > 0,05$).

Na avaliação computadorizada do sêmen imediatamente após a descongelamento, não foi observada diferença entre G4 e G27, nos parâmetros de motilidade total (Figura 1A), motilidade progressiva (Figura 1B), percentual de espermatozoides com velocidade rápida (Figura 1C) e percentual de espermatozoides com velocidade média (Figura 1D). Foi observada uma redução em todos os parâmetros mencionados após 30 minutos de incubação e, a partir deste tempo, uma manutenção desses resultados até 120 minutos. Vale ressaltar que nestes tempos G4 e G27 não diferiram.

Podemos observar ainda na análise computadorizada que G4 e G27 não diferiram imediatamente após a descongelamento nas avaliações de velocidades médias da trajetória (VAP) dos espermatozoides com velocidade rápida (Figura 1E) e com velocidade média (Figura 1F), sendo observada uma redução destas duas velocidades após 30 minutos de incubação em ambos os grupos, não diferindo G4 e G27 neste tempo. Após 90 minutos de incubação, foi observada uma nova redução da VAP dos espermatozoides com velocidade rápida (Figura 1E) que se manteve até 120 minutos, não diferindo G4 e G27 em cada tempo mencionado. Uma segunda redução da VAP dos espermatozoides com velocidade média foi observada apenas aos 120 minutos de incubação, não diferindo G4 e G27 neste tempo.

Foi observada uma baixa motilidade espermática, quando comparada aos resultados obtidos por CARDOSO et al. (2006) e SILVA et al. (2005) que obtiveram respectivamente uma motilidade de 51% e 65% pós descongelamento utilizando diluidor à base de água de coco e Tris, no entanto foi utilizado uma concentração de 20% de gema de ovo de galinha no diluidor, enquanto que no presente trabalho foi utilizado somente 5%.

Sabe-se que a gema de ovo vem sendo adicionada aos diluidores como protetores do resfriamento em concentrações que variam de 3 a 25% (v/v; WATSON, 1979). Sua função é preservar os espermatozoides durante o choque térmico, bem como durante a congelamento e descongelamento (FARSTAD, 1996).

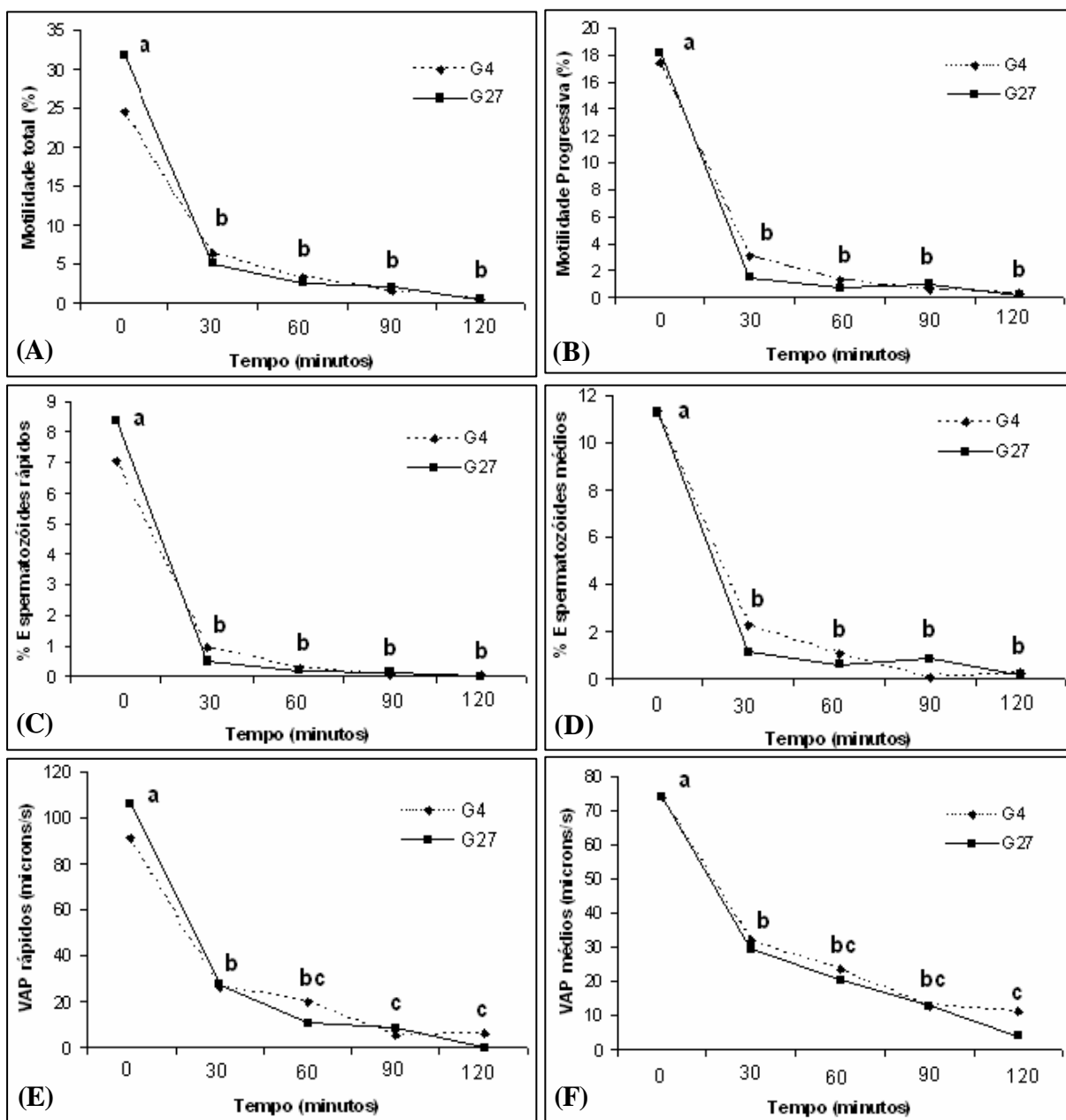


Figura 1. Análise espermática computadorizada pós-descongelção do sêmen canino criopreservado em ACP-106[®], submetido à glicerolização a 4°C (G4) e 27°C (G27). **(A)** Motilidade total (%); **(B)** Motilidade progressiva (%); **(C)** Percentual médio da sub-população de espermatozóides rápidos; **(D)** Percentual médio da sub-população de espermatozóides médios; **(E)** VAP média da sub-população de espermatozóides rápidos; **(F)** VAP média da sub-população de espermatozóides médios (?m/s).

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tempos para ambos os grupos (P < 0,05).

LEI et al. (2007), utilizando diluidor Tris acrescido de 5% de gema de ovo de pomba obtiveram uma motilidade de 35% para o espermatozóide bovino descongelado. CARDOSO (2005), utilizando diluidor ACP-106[®] acrescido de 20% de gema de ovo obteve uma motilidade total de 23%, motilidade progressiva de 18% e uma VAP de 85,3 μ m/s, sendo ambos os resultados semelhante ao observado neste trabalho. CARDOSO (2005) justificou seus baixos resultados devido à insuficiente homogeneização do diluidor com a gema de ovo, formando grumos, aliado à alta viscosidade do meio dificultando a motilidade dos espermatozóides e sua avaliação pelo CASA.

CONCANNON & BATTISTA (1989) sugerem que aproximadamente 40 a 50% de espermatozóides móveis são necessários para obtenção de sucesso na inseminação artificial com sêmen canino congelado, no entanto, gestações vêm sendo obtidas com sêmen congelado com motilidade pós-descongelação entre 20 e 30% (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989).

Foi observada uma baixa longevidade espermática, no entanto, OLAR (1984) sugere que para avaliar a capacidade fecundante do espermatozóide canino, a motilidade imediatamente após a descongelação é mais importante do que sua sobrevivência após incubação.

Sabe-se, ainda, que não foi estabelecida uma relação entre longevidade espermática e o potencial fecundante do sêmen para a espécie canina e que a (VAP) avaliada através da CASA apresenta relação significativa com as interações *in vitro* entre espermatozóides caninos congelados descongelados e oócitos homólogos (SILVA, 2005).

A velocidade média do percurso dos espermatozóides (VAP) neste trabalho encontra-se semelhante à velocidade encontrada por SILVA et al. (2006b), o qual utilizou o diluidor Tris e obteve uma VAP média de 100,9 μ m/s.

Estudos devem ser realizados a fim de melhorar a motilidade pós-descongelação utilizando o diluidor ACP-106[®], sendo talvez a concentração de gema de ovo a grande responsável por essa baixa motilidade uma vez que CARDOSO et al. (2002), testando diversas formas de criopreservação do sêmen canino com água de coco *in natura* observaram que ao se congelar o sêmen com o diluidor à base de água de coco *in natura* + 6% de glicerol e 20% de gema de ovo a motilidade foi de 56,7%, e ao se congelar utilizando somente o diluidor com glicerol, esta motilidade foi reduzida para 22,5%, resultado este semelhante ao observado no presente estudo.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que não há influência da adição do glicerol à temperatura ambiente (27°C) ou após o resfriamento a 4°C, com a utilização do diluidor ACP-106[®], na qualidade do sêmen canino.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FUNCAP pelo apoio financeiro; aos proprietários dos cães, em particular ao Daniel Couto Uchoa, por disponibilizar os animais para o estudo; ao Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo pela colaboração nas análises estatísticas e ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino pela disponibilização de uso do CASA.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. **Zuchtygiene**, v.10, p.1-4, 1975.

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, p.384-391, 2006.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v.59, p.743-751, 2003a.

CARDOSO, R.C.S. **Características *in vitro* do espermatozóide canino criopreservado em água de coco**. 2005. 197p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

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, 2003b.

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

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1998.

CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1988.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, p.1241–1255, 2003.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

IVANOVA-KICHEVA, M.G.; BOBADOV, N.D.; SOMLEV, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, v.48, p.343-349, 1997.

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

NÖTHLING, J. O.; SHUTTLEWORTH, R.; The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. **Theriogenology**, v.63, p.1469-1480, 2005.

OLAR, T.T. **Cryopreservation of Dog Spermatozoa**. 1984. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Colorado State University, 1984.

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.

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

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparason between glycerol and ethilene glycol for dog sêmen cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1848-1858, 2006.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Effect of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1997.

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, A.R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Efeito das etapas do processamento de criopreservação sobre a qualidade do sêmen canino diluído em Tris. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.474-474, 2001.

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

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

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; SOUZA, F.F. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. **Theriogenology**, v.66, p.456-462, 2006b.

SPITTALER, P.J.; TYLER, J.P.P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity os spermatozoal membrane. **Clininical Reproduction and Fertility**, v.3, p.187-190, 1985.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOUIS, G.; MAGISTRINI, M., PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw sperm motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.907–919, 2000.

YILDTZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v.54, p.579-585, 2000.

7. CAPÍTULO 2

Artigo 2

Efeito da adição de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina no sêmen canino criopreservado com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106[®])

Claudia da Cunha Barbosa, Victor Leão Hitzschky Madeira, Ricardo Parente Jucá, Ângela Cristina de Oliveira, Daniel Couto Uchoa, Lúcia Daniel Machado da Silva

Efeito da adição de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina no sêmen canino criopreservado com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106[®])

Effect of different concentration of benzylpenicillin benzatin addition on cryopreserved canine semen using a powdered coconut water extender (ACP-106[®])

Claudia da Cunha Barbosa^{1*}, Victor Leão Hitzschky Madeira¹, Ricardo Parente Jucá¹, Ângela Cristina de Oliveira¹, Daniel Couto Uchoa¹, Lúcia Daniel Machado da Silva¹

¹Laboratório de Reprodução de Carnívoros – Faculdade de Veterinária – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UECE, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi
CEP: 60740-903, Fortaleza, CE, Brasil
Fone: (85) 3101-9859; Fax: (85)3101-9840
e-mail: * clauvet_cb@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de benzilpenicilina benzatina em diferentes concentrações sobre a qualidade espermática, e o controle do crescimento bacteriano no sêmen canino criopreservado em ACP-106[®]. Foram utilizados treze ejaculados, os quais foram avaliados e posteriormente divididos em quatro alíquotas. Cada alíquota foi diluída em ACP-106[®] com 20% de gema de ovo e quatro concentrações de benzilpenicilina benzatina, constituindo os quatro grupos experimentais: G0 (diluído sem antibiótico); G500 (com 500 UI/mL); G1.000 (com 1.000 UI/mL); e G1.500 (com 1.500 UI/mL). Em seguida, as amostras foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido. Após uma semana, as amostras foram descongeladas e submetidas à avaliação espermática e microbiológica. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos após descongelação com relação aos parâmetros seminais avaliados, com exceção no G1.500 que apresentou aumento no número de acrossomas danificados aos 60 minutos. Na avaliação computadorizada, também não foi evidenciada diferença entre os grupos para todos os parâmetros avaliados. Não foi observada diferença entre os grupos para o número de UFC/μL após a descongelação. Conclui-se que a benzilpenicilina benzatina quando adicionada ao ACP-106[®] não controla o crescimento bacteriano e não influencia a qualidade espermática após a criopreservação do sêmen canino.

Palavra chave: criopreservação; sêmen; cão; antibiótico; ACP-106[®]

SUMMARY

The aim of the present study was to analyze the effect of benzylpenicillin benzatin addition in different concentrations on semen quality, and on control of bacterial growth on canine semen cryopreserved in ACP-106[®]. Thirteen ejaculates was used, evaluated and further divided into four aliquots. Each aliquots was extended in ACP-106[®] with 20% egg yolk and four concentrations of benzylpenicillin benzatin, forming four experimental groups: G0 (without antibiotic); G500 (with 500UI/mL); G1.000 (with 1.000UI/mL); and G1.500 (with 1.500UI/mL). After then, the samples were frozen and stored in liquid nitrogen. After about one week, samples were thawed and submitted to spermatic and microbiology evaluations. No differences were observed between groups after thawing regarding seminal parameters, excepted in G1.500 that presented increase on damaged acrosssoma number on 60 minutes. In computerized analyzes, it was also not evidenced differences between groups for all seminal parameters and the same was observed regarding the number of UFC/ μ L after thawing. In conclusion, benzylpenicillin benzatin added to ACP-106[®] do not control bacterial growth and does not influence spermatic quality after canine semen cryopreservation.

Key Words: cryopreservation; semen; dog; antibiotic; ACP-106[®]

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma biotécnica que permite o armazenamento de material genético de machos valiosos por tempo indeterminado e ainda facilita a troca de material genético dentro e entre países, reduzindo custos com transportes de animais, bem como evitando estresse dos reprodutores e transmissão de doenças (CARDOSO et al., 2000).

Sabe-se que apesar dos ejaculados serem estéreis, estes podem se contaminar durante o processo de coleta (WATSON, 1990), bem como durante seu processamento para congelação através da gema de ovo utilizada nos diluidores (BOUSSEAU et al., 1998), com o próprio diluidor, as palhetas, o álcool polivinílico (MARINOV & BOHNEL, 1972), bem como com o nitrogênio líquido e sua fase de vapor (LEVY et al., 2004).

A contaminação bacteriana pode afetar negativamente a fertilidade do espermatozóide pela própria presença das bactérias, pela produção de toxinas e por degradação dos componentes do meio (WATSON, 1990).

A fim de se controlar o crescimento bacteriano, antibióticos vêm sendo adicionados aos diluidores seminais para criopreservação do sêmen de bovinos (MOUSSA et al., 2002), eqüinos (VIDAMENT et al., 2000), suínos (KAWANO et al., 2004) e caninos (PEÑA et al., 2003), sendo a associação clássica de penicilina e estreptomicina a mais utilizada (WATSON, 1979).

Apesar de alguns autores já utilizarem antibióticos em diluidores para criopreservação do sêmen canino (RIJSSELAERE et al., 2002; PEÑA et al., 2003; SCHÄFER-SOMI et al., 2006), ainda há uma carência de estudos sobre a concentração ideal destes, bem como seus efeitos sobre a qualidade espermática canina. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição de benzilpenicilina benzatina em diferentes concentrações sobre a motilidade, morfologia e integridade funcional de membrana do espermatozóide canino criopreservado em um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106[®]), bem como verificar seu efeito sobre o controle do crescimento bacteriano.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Seis cães clinicamente saudáveis foram selecionados, sendo dois da raça Boxer, um Rottweiler, um American Pit Bull Terrier, um Bullmastiff e um Sharpei, com idade entre 18 meses a nove anos. Os cães pertenciam a canis particulares, mantidos em boxes individuais com livre acesso a água e alimentados com ração comercial uma vez ao dia.

Coleta e avaliação de sêmen

Foi utilizado um total de 13 ejaculados, sendo a coleta realizada por meio da técnica de manipulação digital (CHRISTIANSEN, 1988), utilizando-se tubos de vidro graduados acoplados a um funil, sendo as frações seminais separadas por mudança na coloração. A fração rica em espermatozóide foi destinada às avaliações e posterior criopreservação. No sêmen a fresco, foram observados os parâmetros macroscópicos de cor e volume. Os parâmetros microscópicos de motilidade (percentual de espermatozóides com motilidade progressiva e retilínea) e vigor espermático, mensurado em uma escala de 0 (ausência de movimento) a 5 (movimento vigoroso, retilíneo e progressivo; CBRA, 1998) foram avaliados com auxílio de microscópio óptico (100x).

A morfologia espermática e a integridade acrossomal foram avaliadas através da contagem de 200 células em esfregaço úmido corado com rosa de bengala, sendo as células

classificadas como normal ou apresentando alterações primárias ou secundárias, e separadas de acordo com a sua localização (cabeça, peça intermediária e cauda). O acrossoma foi classificado como intacto ou danificado. Estas avaliações foram realizadas através da microscopia óptica, em aumento de 1000x.

A concentração espermática foi mensurada através de contagem em câmara de Neubauer (CARDOSO et al., 2003).

Somente amostras apresentando motilidade = 85%, vigor = 4 e alterações morfológicas totais espermáticas = 15%, foram utilizadas para o experimento.

Processamento do sêmen

Para o trabalho, foi utilizado o diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106[®], ACP BIOTECNOLOGIA[®], Fortaleza-Ceará, Brasil), sendo preparado segundo recomendações do fabricante, com um pH de 7,07 e osmolaridade de 298 mOsm.

Ao ACP-106[®] foram adicionados 20% de gema de ovo, constituindo desta forma o diluidor base. A partir do diluidor base, foram preparados quatro diluidores: D0 (diluidor base sem benzilpenicilina benzatina), D5 (diluidor base + 500 UI/mL de benzilpenicilina benzatina), D1.000 (diluidor base + 1.000 UI/mL de benzilpenicilina benzatina) e D1.500 (diluidor base + 1.500 UI/mL de benzilpenicilina benzatina). Estes quatro diluidores foram divididos em duas partes, A e B. À parte B, foi acrescido glicerol, na concentração de 12%.

Inicialmente, o sêmen, após prévia avaliação, foi dividido em quatro alíquotas de igual volume, constituindo desta forma, quatro grupos experimentais. Cada grupo foi diluído com 1/2 parte do diluidor A necessário para atingir uma concentração final de 200×10^6 espermatozóides/mL; G0 (diluído com D0), G500 (diluído com D500), G1.000 (diluído com D1.000) e G1.500 (diluído D1.500).

Após a primeira diluição, os grupos armazenados em tubos de vidro foram colocados em um recipiente com água e acondicionados em caixa térmica com gelo reciclável (15°C) por 40 minutos. Em seguida, os grupos foram transferidos para um refrigerador até atingir 4°C e lá permanecendo por 30 minutos.

A segunda diluição foi realizada a 4°C de forma simples com a outra 1/2 parte do diluído B de cada grupo. Após 15 minutos desta segunda diluição, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, sendo dispostas horizontalmente em rampa de congelação a uma altura de 5 cm do nível de nitrogênio líquido por cinco minutos e finalmente, armazenadas em nitrogênio líquido.

Teste de termoresistência e análise da motilidade espermática auxiliada por computador

Após uma semana, o sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 1 minuto, depositado em um tubo Eppendorf® e destinado ao teste de termoresistência. Neste teste, o sêmen foi mantido em banho-maria a 37°C e avaliado imediatamente e 30, 60 e 90 minutos após a descongelação, a fim de se avaliar a longevidade espermática (SILVA et al., 2003).

Após a descongelação e com 60 minutos de incubação, foi realizada a avaliação do percentual de espermatozóides vivos, através de esfregaços de sêmen corados com azul de bromofenol. Foram contadas 100 células com auxílio de microscópio de luz, com aumento de 400x, sendo classificados como vivos os espermatozóides que não estavam corados. Nestes dois tempos de incubação, também foram avaliadas a morfologia espermática e integridade do acrossoma, com lâminas coradas com rosa de bengala.

Foi realizada, ainda, a análise computadorizada da motilidade espermática, com auxílio de um microscópio de contraste de fases acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema *Sperm Class Analyser*® (SCA, Microptic S.L., versão 3.2.0).

Para a análise computadorizada, foi realizada uma re-diluição da amostra, sendo 10µl da amostra homogeneizada em um segundo tubo Eppendorf®, contendo 50 µl de uma solução de citrato de sódio-glicose a 37°C (2,37 g citrato de sódio, 0,80 g glicose, 100 mL água destilada), a fim de se atingir uma concentração de 20 a 50x10⁶ de spz/mL. Cinco µl da amostra re-diluída foi colocada em uma Câmara de Makler® (Sel-Medical Instruments), previamente aquecida a 37°C, sendo avaliados os parâmetros de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade média do percurso do espermatozóide (VAP, µm/s), e % de sub-populações de espermatozóides com velocidade média (VAP 55 a 95 µm/s) e rápida (VAP > 95 µm/s).

Teste hipoosmótico

O teste hipoosmótico foi realizado após a coleta e, imediatamente após a descongelação do sêmen. Para isso, 0,01 mL de sêmen foi diluído em 0,09 mL de solução hipoosmótica (água destilada) e mantido em banho-maria a 38°C por 45 minutos. Após este período, uma alíquota espermática foi colocada em uma lâmina de vidro, coberta com lamínula, sendo contadas 200 células com auxílio de microscópio ótico com aumento de 400x. Os espermatozóides que apresentaram sua cauda enrolada foram considerados como apresentando membrana espermática funcional (SPITTALER & TYLER, 1985).

Análise microbiológica do sêmen

Para a análise microbiológica do sêmen, foram utilizadas as técnicas de contagem padrão em placas e diluições seriadas (TORTORA et al., 2005), a qual consistiu da análise de uma palheta de cada grupo. Para tanto, as palhetas foram descongeladas em temperatura ambiente (27°C) por 5 minutos e, em seguida, o sêmen a uma temperatura aproximada de 27°C foi acondicionado em microtubos Eppendorf®. Dessas amostras, 100 µl foram serialmente diluídos em tubos de vidro contendo 900 µl de solução salina peptonada 0,01%, a fim de se obter diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁴. Em seguida, 100 µl de cada diluição foram inoculados em placas de Petri, contendo 10 mL do ágar tryptic soy (Merck®), utilizando o método de semeadura de superfície (TORTORA et al., 2005). Todos esses procedimentos foram realizados assepticamente e a inoculação das placas foram realizadas em duplicata.

As placas semeadas foram incubadas à temperatura de 35°C ± 2, por 18 a 24 horas. Após este período, foi realizada a contagem das colônias através da observação visual. Foram contadas as colônias das placas da diluição que apresentassem uma melhor individualização das colônias, sendo realizada uma média do número de colônias das duas placas. O resultado da contagem foi expresso em unidades formadoras de colônias por microlitro de amostra (UFC/µL), utilizando a fórmula: $UFC = N \times ID$ (N representa o número de colônias observadas e ID o inverso da diluição).

Análise estatística

No sêmen fresco a cor foi avaliada de forma subjetiva, sendo o volume da fração espermática, e as características microscópicas do sêmen avaliados pela estatística descritiva e expressas na forma de média e erro padrão. Os parâmetros avaliados após a descongelação foram expressos na forma de média e erro padrão, e analisados pelo programa *Systat 7.0* (SPSS Inc. 1997). Dados percentuais sofreram transformação angular arcoseno. ANOVA-GLM (*General Linear Model*) foi utilizada para verificar diferenças estatísticas entre os grupos e os tempos de avaliação. As medias foram comparadas pelo teste de Tukey para se verificar a interação do efeito da temperatura de adição do glicerol e do tempo de incubação. Para todas as análises utilizou-se $p < 0,05$. Para comparação entre os grupos quanto ao número de UFC/µL foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen a fresco apresentou cor branca opalescente, pH $5,92 \pm 0,11$; volume $1,62 \pm 0,2$ mL; concentração $782,31 \pm 76,07 \times 10^6$ spz/mL; motilidade $99,23 \pm 0,77\%$; vigor 5 ± 0 ; total de espermatozóides normais $96,05 \pm 0,66\%$ e total de espermatozóides com acrossoma intacto, $99,40 \pm 0,30\%$. Todos os parâmetros avaliados foram considerados normais para a espécie canina (CBRA, 1998) e estavam dentro dos critérios qualitativos preconizados para o estudo, possibilitando, assim, a utilização dos ejaculados para o experimento.

A avaliação da morfologia espermática é uma ferramenta a mais para a avaliação espermática. OETTLÉ (1993) relatou que a fertilidade é afetada quando a proporção de espermatozóides morfológicamente normais está abaixo de 60%. Após a descongelação, foi observado que o percentual total de espermatozóides morfológicamente normais não sofreu efeito das diferentes concentrações de antibiótico, tanto imediatamente após, quanto aos 60 minutos de incubação ($P > 0,05$ - Tabela 1), ficando a morfologia dentro dos padrões para garantir a fertilidade dos espermatozóides (OETTLE, 1993).

Quando avaliada de forma isolada, o percentual de alterações totais de cauda aumentou com o tempo de incubação para G0 e G1.000 ($P < 0,05$ - Tabela 1), sendo encontradas principalmente alterações secundárias, evidenciando que provavelmente esse aumento no número de alterações seja devido a alterações ocorridas pelo processamento do sêmen e não por influência do antibiótico, visto que este aumento também foi evidenciado no grupo sem antibiótico (G0).

A integridade do acrossoma é fundamental no processo de fertilização, sendo que sua integridade é significativamente reduzida após congelação e descongelação (SILVA & VERSTEGEN, 1995). Em nosso trabalho, podemos verificar que somente no G1.500 houve redução no percentual de acrossomas intactos após 60 minutos de incubação ($P < 0,05$) (Tabela 1), o que pode ser explicado por alterações ocorridas durante a congelação e descongelação (SILVA & VERSTEGEN, 1995), associado à elevada concentração do antibiótico e um prolongado período de incubação, visto que alterações de acrossoma também foram relatadas quando utilizadas doses elevadas de antibióticos incubadas por um tempo prolongado no sêmen equino refrigerado (VIEIRA et al., 2002).

A integridade e função da membrana plasmática são essenciais para viabilidade celular, pois a permeabilidade seletiva da membrana plasmática mantém a atividade metabólica intracelular, composições iônicas e pH. Na célula espermática, a membrana plasmática funcional é essencial para o evento de fusão com o ócito (ROTA et al., 1997).

No sêmen a fresco, foi observado que $95,53 \pm 0,63\%$ dos espermatozóides apresentavam membrana funcional, sendo observada uma redução em todos os grupos testados quanto ao percentual de espermatozóides com membrana funcional após a descongelação ($P < 0,05$), não sendo observada diferença entre os grupos ($P > 0,05$ - Tabela 2), evidenciando que a adição de benzilpenicilina benzatina não afetou o percentual de membrana funcional. Esta redução no percentual de espermatozóides com membrana funcional já era esperado, visto que o processamento de congelação e descongelação causam alterações na membrana plasmática que muitas vezes podem ser irreversíveis (WATSON, 1995).

O percentual de espermatozóides vivos está representado na Tabela 3, na qual foi verificada que não houve diferença entre os grupos, tanto no tempo 0 minuto, quanto aos 60 minutos ($P > 0,05$), sendo observada uma redução no percentual de espermatozóides vivos, para todos os grupos, exceto no G500, após 60 minutos de incubação ($P < 0,05$).

A redução no número de espermatozóides vivos após a descongelação pode ser explicada pelos danos ocorridos aos espermatozóides pelas mudanças de temperatura, pelo estresse osmótico e tóxico da exposição ao crioprotetor e, pela formação e dissolução de gelo no meio extracelular (WATSON, 2000).

Na avaliação computadorizada da motilidade após a descongelação (Figura 1), não foram evidenciadas diferenças entre os grupos para o mesmo tempo de avaliação, em todos os parâmetros avaliados ($P > 0,05$). Imediatamente após a descongelação, foi observada, nos grupos, uma motilidade total variando de 41,78 a 47,05% (Figura 1A); uma motilidade progressiva de 30,77 a 34,72% (Figura 1B); percentual de espermatozóides com velocidade rápida de 17,18 a 21,55% (Figura 1C); percentual de espermatozóides com velocidade média de 14,07 a 15,82% (Figura 1D); VAP dos rápidos de 112,88 a 91,03 $\mu\text{m/s}$ (Figura 1E); VAP dos médios de 80,08 a 78,29 $\mu\text{m/s}$ (Figura 1F).

Aos 30 minutos de incubação foi verificada uma redução em todos os parâmetros avaliados quando comparado com o tempo 0' ($P < 0,05$), não diferindo entre os grupos ($P > 0,05$), sendo observada uma motilidade total variando de 7,64 a 11,78%, uma motilidade progressiva de 3,24 a 5,08%; percentual de espermatozóides com velocidade rápida de 1,58 a 2,54%, percentual de espermatozóides com velocidade média de 1,65 a 2,72%; VAP dos rápidos de 49,92 a 57,44 $\mu\text{m/s}$; VAP dos médios de 38,44 a 47,6 $\mu\text{m/s}$ (Figura 1).

Pode-se observar, ainda, que com o passar do tempo de incubação houve uma redução de todos os parâmetros avaliados, não diferindo os grupos entre si em cada tempo

avaliado. Evidenciando, assim, que a concentração de benzilpenicilina benzatina não afeta os parâmetros de motilidade avaliados pelo CASA.

A motilidade espermática é o principal parâmetro microscópico avaliado no sêmen descongelado (ENGLAND, 1993), sendo considerada como ideal para inseminação artificial uma motilidade pós-descongelação acima de 50% e aceitável a cima de 30% (CONCANNON & BATTISTA, 1989). Desta forma, as amostras deste trabalho estariam aptas para serem utilizadas para inseminação artificial.

Outro parâmetro que deve ser levado em conta na avaliação do sêmen congelado é a velocidade média do percurso (VAP), pois esta foi correlacionada com a interação entre oócitos homólogos e espermatozóides (SILVA, 2005). Os resultados encontrados neste trabalho para as VAPs dos espermatozóides com velocidade rápida e média, estão próximos aos observados por SILVA et al. (2006b), o qual observou uma VAP média de $100,9 \pm 7,4$ $\mu\text{m/s}$ e, ROTA et al. (2006) com uma VAP de $87,8 \pm 7,4$ $\mu\text{m/s}$, ambos utilizando diluidor Tris sem antibióticos.

Podemos verificar que o número de espermatozóides classificados como apresentando velocidade rápida foi inferior ao observado por CARDOSO (2005) que verificou um intervalo de 1 a 38% de espermatozóides rápidos. No entanto, o percentual de espermatozóides com velocidade média foi superior ao observado por CARDOSO (2005) que encontrou um intervalo de 0 a 8%. Acreditamos que esta diferença no percentual das diferentes subpopulações se deva pela utilização de diferentes aparelhos de CASA, visto que CARDOSO (2005) utilizou o sistema *Hamilton Thorne* e em nosso trabalho, foi utilizado o sistema *Sperm Class*.

SILVA et al. (2006b), não verificaram relação entre as sub-populações de espermatozóides com interações de espermatozóides-oócito em cães. Os autores também supuseram que a habilidade de fertilização in vitro não está relacionada à sub-população de espermatozóides rápidos e sim a distribuição entre as várias populações espermáticas.

A adição de antibióticos não foi eficiente para controlar o crescimento bacteriano, visto que, após a descongelação, não foi evidenciada diferença entre os grupos quanto ao número de UFC/ μL de amostra (Tabela 4). Este resultado pode ser explicado, pois neste trabalho foi utilizado somente um antibiótico, visto que a maioria dos trabalhos utiliza associações de antibióticos (PEÑA et al, 2003; SCHÄFER-SOMI et al., 2006). Outra possibilidade é o fato da existência de relatos de resistência bacteriana aos antibióticos penicilina e estreptomicina, o qual foi relatado para o sêmen caprino (SOUZA et al., 2006).

Vale ressaltar que a presença de microrganismos nem sempre é um indicador de infecção, sendo a concentração e o tipo de bactéria os fatores mais importantes para determinação de contaminação ou infecção (COTTELL et al., 1997).

Desta forma, estudos são necessários para se identificar quais os tipos de bactérias estão presentes no sêmen canino descongelado para sabermos se as mesmas são potenciais transmissores de doenças ou somente bactérias oportunistas. É necessária também a avaliação da eficiência de outros antibióticos, bem como suas associações para o controle do crescimento microbiano no sêmen canino descongelado.

Tabela 1: Média \pm erro padrão da morfologia espermática, alterações de cabeça, peça intermediária, cauda, total de espermatozoides normais e total de espermatozoides com acrossoma intacto, imediatamente após a descongelação e após 60 minutos de incubação a 37°C, do sêmen canino criopreservado em ACP-106[®] acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina.

%	Sêmen descongelado			
	G0	G500	G1.000	G1.500
Alterações de cabeça				
0'	0,38 \pm 0,13 ^{aA}	0,54 \pm 0,18 ^{aA}	0,85 \pm 0,24 ^{aA}	0,27 \pm 0,11 ^{aA}
60'	0,42 \pm 0,15 ^{aA}	0,19 \pm 0,09 ^{aA}	0,37 \pm 0,12 ^{aA}	0,46 \pm 0,17 ^{aA}
Alterações de peça intermediária				
0'	1,65 \pm 0,32 ^{aA}	1,54 \pm 0,37 ^{aA}	0,85 \pm 0,18 ^{aA}	0,85 \pm 0,26 ^{aA}
60'	1,35 \pm 0,46 ^{aA}	0,46 \pm 0,20 ^{aA}	1,08 \pm 0,29 ^{aA}	1,15 \pm 0,18 ^{aA}
Alterações de cauda				
0'	4,00 \pm 0,58 ^{aA}	3,67 \pm 0,61 ^{aA}	3,81 \pm 0,75 ^{aA}	3,81 \pm 0,62 ^{aA}
60'	6,23 \pm 0,74 ^{aB}	5,65 \pm 0,91 ^{aA}	5,75 \pm 0,70 ^{aB}	4,61 \pm 0,36 ^{aA}
Espermatozoides normais				
0'	93,88 \pm 0,80 ^{aA}	94,25 \pm 0,89 ^{aA}	94,38 \pm 0,85 ^{aA}	95,08 \pm 0,72 ^{aA}
60'	92,00 \pm 1,00 ^{aA}	93,69 \pm 0,95 ^{aA}	92,79 \pm 0,72 ^{aA}	93,69 \pm 0,47 ^{aA}
Acrossomas intactos				
0'	95,65 \pm 1,34 ^{aA}	97,37 \pm 0,31 ^{aA}	97,58 \pm 0,41 ^{aA}	97,27 \pm 0,27 ^{aA}
60'	88,92 \pm 6,61 ^{aA}	95,88 \pm 0,74 ^{aA}	96,67 \pm 0,62 ^{aA}	95,69 \pm 0,68 ^{aB}

^{a,b} Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as colunas.

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os tempos para cada tratamento.

(P < 0,05).

0': zero minuto; 60': sessenta minutos.

Tabela 2. Média \pm erro padrão do percentual de espermatozoides com membrana funcional no sêmen a fresco e após a descongelção do sêmen canino criopreservado em ACP-106[®] acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina.

Grupos	Espermatozoides com membrana funcional (%)
Sêmen fresco	95,53 \pm 0,63 ^a
Descongelado	
G0	54,50 \pm 4,48 ^b
G500	56,42 \pm 5,14 ^b
G1000	61,23 \pm 3,93 ^b
G1500	56,15 \pm 4,93 ^b

^{a,b} Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as linhas ($P < 0,05$).

Tabela 3. Média \pm erro padrão do percentual de espermatozoides vivos após a descongelção do sêmen canino criopreservado em ACP-106[®] acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina ($P < 0,05$).

Grupos	Espermatozoides vivos (%)	
	0'	60'
G0	42,23 \pm 4,05 ^{aA}	28,46 \pm 4,98 ^{bA}
G500	41,58 \pm 4,74 ^{aA}	29,31 \pm 4,70 ^{aA}
G1.000	49,96 \pm 3,36 ^{aA}	29,54 \pm 5,06 ^{bA}
G1.500	42,92 \pm 4,74 ^{aA}	25,35 \pm 5,02 ^{bA}

^{a,b} Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as colunas.

^A Indica que não há diferença entre as linhas.

Tabela 4. Média \pm erro padrão do número de unidades formadoras de colônia por microlitros de amostra (UFC/ μ L) após a descongelção, do sêmen canino criopreservado em ACP-106[®] acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina ($P > 0,05$).

Grupos	UFC/ μ L
G0	5,9x10 ³ \pm 3,6x10 ³
G500	4,2x10 ³ \pm 2,3x10 ³
G1.000	1,5x10 ³ \pm 0,9x10 ³
G1.500	2,3x10 ³ \pm 1,4x10 ³

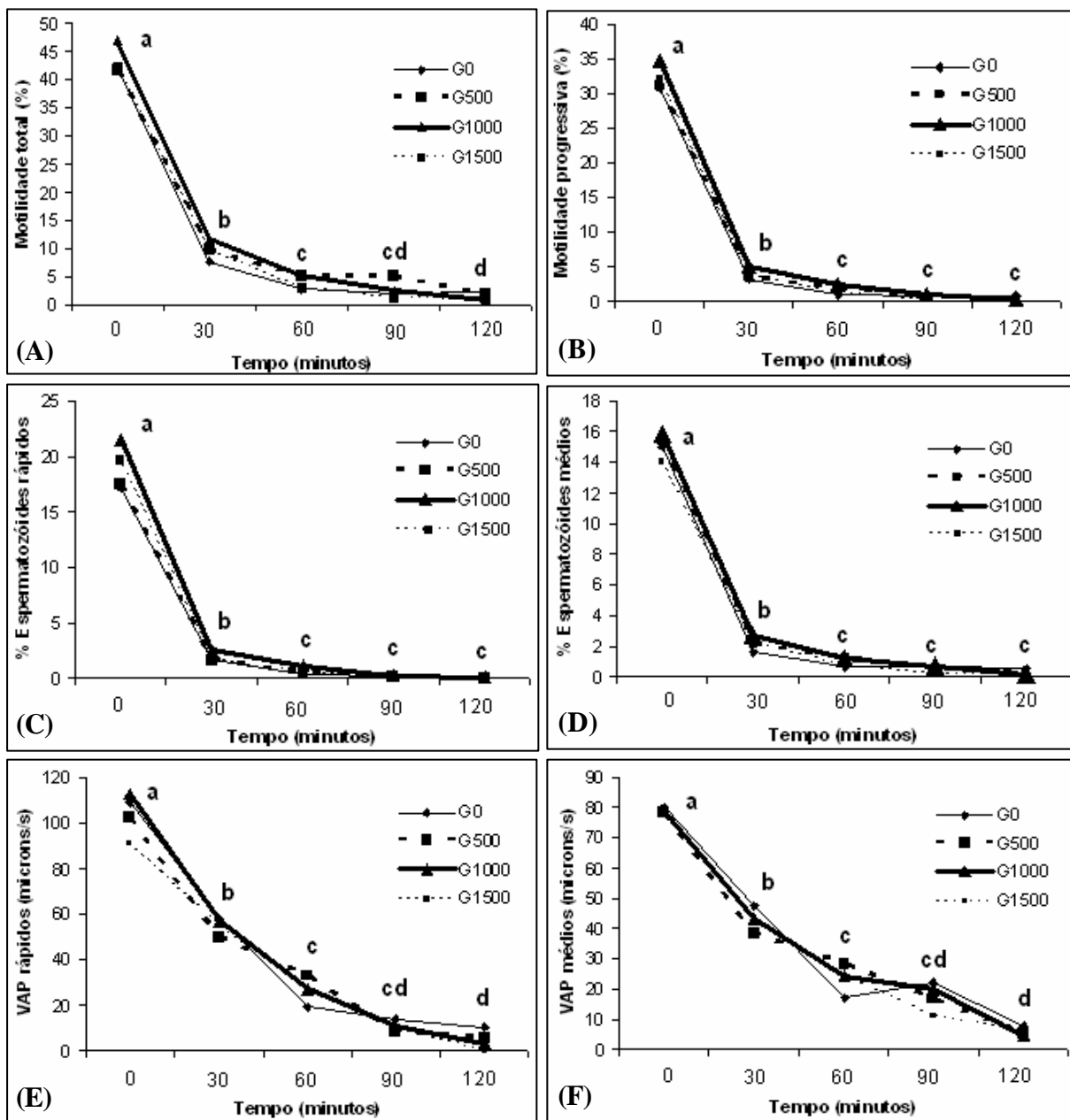


Figura 1. Análise espermática computadorizada pós-descongelamento do sêmen canino criopreservado em ACP-106[®], acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina. (A) Motilidade total (%); (B) Motilidade progressiva (%); (C) Percentual médio da sub-população de espermatozoides rápidos; (D) Percentual médio da sub-população de espermatozoides médios; (E) VAP média da sub-população de espermatozoides rápidos; (F) VAP média da sub-população de espermatozoides médios (?m/s).

a,b,c Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tempos para todos os grupos avaliados ($P < 0,05$).

CONCLUSÕES

Conclui-se que o antibiótico benzilpenicilina benzatina quando adicionado em diferentes concentrações ao diluidor ACP-106[®], não afetou à motilidade, integridade funcional de membrana e morfologia do espermatozóide canino criopreservado, e porém não foi eficiente contra o crescimento bacteriano.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FUNCAP pelo apoio financeiro; aos proprietários dos cães, em particular ao Daniel Couto Uchoa, por disponibilizar os animais para o estudo; ao Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo pela colaboração nas análises estatísticas, a Prof. Dra. Adriana de Queiroz Pinheiro pela ajuda com as análises microbiológicas, ao Laboratório de Microbiologia Veterinária pela disponibilização dos meios de cultivo e equipamentos, e ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino pela disponibilização de uso do CASA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, B.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699-706, 1998.

CARDOSO, R.C.S. **Características *in vitro* do espermatozóide canino criopreservado em água de coco**. 2005. 197p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

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.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Congelação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. **Ciência Animal**, v.10, p.29-36, 2000.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1998.

CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1988.

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

COTTELL, E.; BARRY-KINSELLA, C.; LENNON, B.; HARRISON, R.F.; MCMORROW, J. Processing of semen in an antibiotic-rich culture medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.65, n.1, p.98-103, 1997.

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

KAWANO, N.; SHIMADA, M.; TERADA, T. Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. **Theriogenology**, v.61, p. 351-364, 2004.

LEVY, R.; GRATTARD, F.; MAUBON, I.; ROS, A. POZZETTO, B. Bacterial risk and sperm cryopreservation. **Andrologia**, v.36, p. 282-285, 2004.

MARINOV, P.; BOHENEL, H. Higienic conditions of materials of freezing bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n.6, p.707-711, 1972.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.

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

PEÑA, A.I.; LUGILDE, L.L.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P.G.; QUINTELA, L.A. Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, p.1725-1739, 2003.

RIJSSELAERE, T.; SOON, A.V.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1669-1681, 2002.

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparason between glycerol and ethilene glycol for dog sêmen cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1848-1858, 2006.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Effect of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1997.

SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E.; KLEIN, D.; AURICH, C. Effect of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, p.173-182, 2006.

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, 2005.

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

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; SOUZA, F.F. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. **Theriogenology**, v.66, p.456-462, 2006.

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

SOUZA, A.F.; GUERRA, M.M.P.; COLETO, Z.F.; MOTA, R.A.; SILVA, L.B.G.; LEÃO, A.E.D.S.; SOBRINHO, E.S.N. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Brasilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.43, n.3, p.329-336, 2006.

SPITTALER, P.J.; TYLER, J.P.P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity of spermatozoal membrane. **Clinical Reproduction and Fertility**, v.3, p.187-190, 1985.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia* São Paulo: Artmed, 8^a ed., p.155–182, 2005.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOUIS, G.; MAGISTRINI, M., PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw sperm motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.907–919, 2000.

VIEIRA, M.J.; MATTOS, A.L.G.; MALSCHITZKY, E.; GARBADE, P.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Agentes antimicrobianos no diluente de sêmen equino e seus efeitos na motilidade, na membrana acrossômica e nas taxas de prenhez. **Ata Scientiae Veterinariae**, v.30, n.2, p.93-99, 2002.

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

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

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

8. CONCLUSÕES

1. O diluidor ACP-106[®] glicerolizado adicionado ao sêmen canino a 27°C preserva as características seminais pós-descongelção semelhantes àsquelas do sêmen glicerolizado a 4°C.

2. A benzilpenicilina benzatina quando adicionado em diferentes concentrações ao diluidor ACP-106[®], não afeta a motilidade, integridade funcional de membrana e morfologia do espermatozóide canino criopreservado, bem como não controla o crescimento bacteriano.

9. PERSPECTIVAS

O aperfeiçoamento da técnica de criopreservação utilizando o diluidor ACP-106[®] é de fundamental importância para sua posterior utilização em escala comercial. Desta forma, este trabalho veio ressaltar a eficiência deste diluidor para criopreservação do sêmen canino, facilitando sua utilização, uma vez que o mesmo pode ser utilizado com glicerol a temperatura ambiente, resultando em uma única diluição, facilitando o processamento do sêmen.

No entanto, estudos ainda são necessários para se verificar a necessidade e a eficiência da adição de antibióticos ao ACP-106[®] para criopreservação do sêmen canino.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. **Zuchtygiene**, v.10, p.1-4, 1975.

ANDRADE, S.F.; GIUFFRIDA, R.; RIBEIRO, M.G. **Quimioterápicos antimicrobianos e antibióticos**. Manual de terapêutica veterinária. São Paulo: Ed. Roca, p.13-58, 2002.

BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D.; YOUNGQUIST, R.S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extender on canine spermatozoa motility, **Theriogenology**, v.34, p.147-157, 1990.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, B.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699-706, 1998.

CARDOSO, R.C.S. **Características *in vitro* do espermatozóide canino criopreservado em água de coco**. 2005. 197p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 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, p.384-391, 2006.

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, 2003b.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Use of the alternative extender powder coconut water (PCW 106[®]) for canine semen freezing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, n.5, 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2004, p.96-97.

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

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Congelação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. **Ciência Animal**, v.10, p.29-36, 2000.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v.59, p.743-751, 2003a.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1998.

CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1988.

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

COTTELL, E.; BARRY-KINSELLA, C.; LENNON, B.; HARRISON, R.F.; MCMORROW, J. Processing of semen in an antibiotic-rich culture medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.65, n.1, p.98-103, 1997.

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

DAHLBOM, M., ANDERSSON, M.; VIERULA, M.; ALANKO, M. Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. **Theriogenology**, v.48, p.687-698, 1997.

DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency which an image analyzing computer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.55, p.161-166, 1979.

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

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

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

FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.25, p.32-36, 1964.

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

GARY, C.A.; LU, LU, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, v.63, p.573-584, 2005.

GENOVEZ, M.E; ESCARCELLI, E.P.; FACIOLLI, M.R.; CARDOSO, M.V.; TEIXEIRA, S.R. Avaliação bacteriológica de sêmen “in natura” e industrializado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.403-405, 1999.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, p.1241–1255, 2003.

GÜNZEL-APEL, A.R.; GUNTHER, C.; TERHAER, P.; BADER, H. Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.271-278, 1993.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

HUYSER, C.; LOSKUTOFF, M.N.; SINGH, R.; LINDEQUE, K.; BECKER, P. A novel antibiotic cocktail for eliminating bacteria in human semen. **International Congress Series**, v.1271, p.205-209, 2004.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the “Hamilton Thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.733-749, 2001.

IVANOVA-KICHEVA, M.G.; BOBADOV, N.D.; SOMLEV, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, v.48, p.343-349, 1997.

KAWANO, N.; SHIMADA, M.; TERADA, T. Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. **Theriogenology**, v.61, p. 351–364, 2004.

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.

LATORRE, L.B.L.M.; JESUS, V.L.T.; GABRIEL, A.M.A.; PALHANO, H.B.; TRÉS, J.E. Flora bacteriana aeróbica e sensibilidade antimicrobiana do sêmen, usados na avaliação reprodutiva canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, 1999.

LEVY, R.; GRATTARD, F.; MAUBON, I.; ROS, A. POZZETTO, B. Bacterial risk and sperm cryopreservation. **Andrologia**, v.36, p. 282-285, 2004.

MADEIRA, V.L.H.; SILVA, L.D.M.; CARDOSO, J.F.S.; SILVA, A.R.; UCHOUA, 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,

MAGALHÃES, M.P.; GOMES, F.S.; MODESTA, R.C.D., MATTA, V.M., CABRAL, L.M.C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.72-77, 2005.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; MOCÉ, E.; VIUDES-DE-CARTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; RODRIGUEZ, M. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for cryopreservation of ovine sêmen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.438-441, 2004.

MARINOV, P.; BOHENEL, H. Higienic contictions of materials of freezing bovine semen. **Jonal of Dairy Science**, v. 57, n.6, p.707-711, 1972.

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

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.

NEVILLE, W.J.; MACPHERSON, J.W.; KING, G.J. The contraceptive action of glycerol in gilts. **Journal of Animal Science**, v.31, p.227, 1970.

NÖTHLING, J. O.; SHUTTLEWORTH, R.; The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. **Theriogenology**, v.63, p.1469-1480, 2005.

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

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, 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. Sperm morphology and fertility in the dog. **Jornal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.257-260, 1993.

OLAR, T.T. **Cryopreservation of Dog Spermatozoa**. 1984. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Colorado State University, 1984.

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.

PEÑA, A.I. **Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion descongelacion.**, 1997. 329p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, 1997.

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

PEÑA, A.I.; LUGILDE, L.L.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P.G.; QUINTELA, L.A. Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, p.1725-1739, 2003.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKRS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, v.164, 1949.

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.

RIJSSELAERE, T.; SOOM, A.V.; MAES, D. KRUIF, A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, v.60, p.1553–1568, 2003.

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.; SOOM, A.V.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1669-1681, 2002.

RODRIGUES, B. A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado**. 1997. 176p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EKWALL. H.; LINDE-FORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.279-285, 1993.

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparason between glycerol and ethilene glycol for dog sêmen cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1848-1858, 2006.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Effect of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1997.

ROWSON, L.E.A. Infertility of cow, sow and bitch. **Irish Veteterinary Journal**, v.8, p.216-21, 1954.

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.

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.

SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E.; KLEIN, D.; AURICH, C. Effect of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, p.173-182, 2006.

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

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, A.R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Efeito das etapas do processamento de criopreservação sobre a qualidade do sêmen canino diluído em Tris. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.474-474, 2001.

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

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Comparação entre a água de coco em pó (ACP[®]) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Animal Reproduction Science**, v.43, n.6, p.767-774, 2006c.

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

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; SOUZA, F.F. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. **Theriogenology**, v.66, p.456-462, 2006b.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Gestação em cadela obtida por inseminação artificial com sêmen congelado no Brasil. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA, X, 2001, Lages. **Anais...** Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina, p.112-113, 2001.

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

SOUZA, A.F.; GUERRA, M.M.P.; COLETO, Z.F.; MOTA, R.A.; SILVA, L.B.G.; LEÃO, A.E.D.S.; SOBRINHO, E.S.N. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.43, n.3, p.329-336, 2006.

SPITTALER, P.J.; TYLER, J.P.P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity of spermatozoal membrane. **Clinical Reproduction and Fertility**, v.3, p.187-190, 1985.

STOREY, K.B.; MOSSER, D.D.; DOUGLAS, D.N.; GRUNDY, J.E.; STOREY, J.M. Biochemistry below 0 °C: nature's frozen vertebrates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.283-307, 1996.

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.

SU, L.; LI, X.; QUAN, J.; YANG, S.; LI, Y.; HE, X.; TANG, X. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. **Animal Reproduction Science**, article in press, 2007.

TONIOLLI, R.; FIÚZA, R. F.; JATAHY, P. C.; BARROS, D.Q.; SANTOS, B.S. Efeito do uso de diferentes antibióticos no controle bacteriano do ejaculado do varrão. **Ciência Animal**, v.11, n.1, p.39-45, 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L.; Crescimento microbiano. Microbiologia São Paulo: Artmed, 8ª ed., p.155–182, 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.; SATIZINGER, 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.

VARNER. D.D.; SCANLAN, C.M.; THOMPSON, J.A.; BRUMBAUGH, G.W.; BLANCHARD, T.L.; CARLTON, C.M.; JOHNSON, L. Bacteriology of preserved stallion sêmen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**, v.50, p.559-573, 1998.

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.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOUIS, G.; MAGISTRINI, M., PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw sperm motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.907–919, 2000.

VIEIRA, M.J.; MATTOS, A.L.G.; MALSCHITZKY, E.; GARBADE, P.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Agentes antimicrobianos no diluente de sêmen equino e seus efeitos na motilidade, na membrana acrossômica e nas taxas de prenhez. **Ata Scientiae Veterinariae**, v.30, n.2, p.93-99, 2002.

VISSER, I.J.R.; LAAK, E.A.; JANSEN, H.B. Failure of antibiotics gentamycin, tylosin, lincomycin and aspectinomycin to eliminate Mycoplasma bovis in artificially infected frozen bovine semen. **Theriogenology**, v.51, p.689-697, 1999.

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

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

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

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v.1, p.183-350, 1979.

WOODALL, P.F.; JOHNSTONE, I.P.; Dimension and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog. **Journal of Reproduction and Fertility** v.82, p.603-609, 1988.

YILDITZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v.54, p.579-585, 2000.

11. ANEXOS

Anexo A. Composição do corante **Rosa de Bengala** para avaliação da morfologia espermática.

20 mL de água destilada

0,58 g de citrato de sódio

0,8 mL de formaldeído

0,3 g de Rosa de Bengala

OBS.: Após a mistura dos três primeiros componentes, a solução é homogeneizada e acrescenta-se o Rosa de Bengala.

Anexo B. Composição do corante **Azul de Bromofenol** para avaliação do percentual de espermatozoides vivos.

0,1 g de azul de bromofenol

0,4 g de citrato de sódio

10 mL de água destilada

OBS.: Deverá ser medida a osmolaridade da solução e se necessário, ajustada com água destilada até ficar entre 300 e 310 mOsm.

Anexo C. Diluidor à base de água de coco em pó (ACP-106[®]) para criopreservação de sêmen canino.

4,25 g ACP-106[®]

50 mL de água destilada

OBS.: pH 7,07 e osmolaridade de 298 mOsm.

Anexo D. Composição do meio de re-diluição (solução de citrato de glicose) para avaliação no CASA

100 mL de água destilada

0,08 g de glicose

2,37 g de citrato de sódio

OBS.: pH 7,5 e osmolaridade de 300 mOsm

Anexo E. Composição dos meios utilizados para análise microbiológica

1. Solução salina peptonada 0,01%

8,5 g cloreto de sódio

1,0 g de peptona

1.000 mL de água destilada/deionizada

OBS.: pH $7,2 \pm 0,2$

OBS.: Misturar os componentes e agitar com auxílio de um bastão de vidro até a dissolução. Autoclavar a 121°C por 15 minutos e armazenar adequadamente.

2. Agar tryptic soy

40 g do ágar tryptic soy (Merck[®])

1.000 mL de água destilada

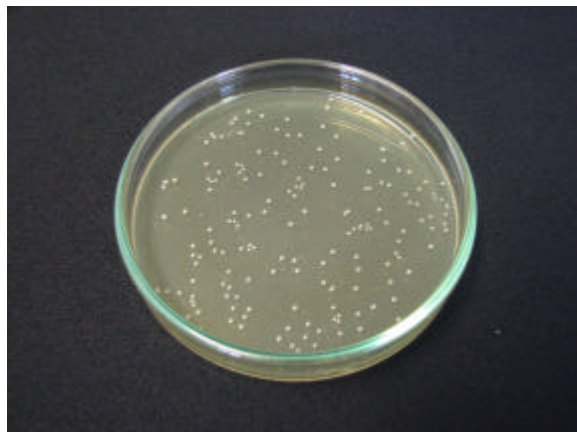
OBS.: pH $7,3 \pm 0,21$ a 25°C

OBS.: Misturar o ágar com a água destilada, aquecer até que o ágar se dissolva e autoclavar o meio por 15 minutos a 121°C . Esperar esfriar e distribuir em placas de Petri autoclavadas. Armazenar adequadamente.

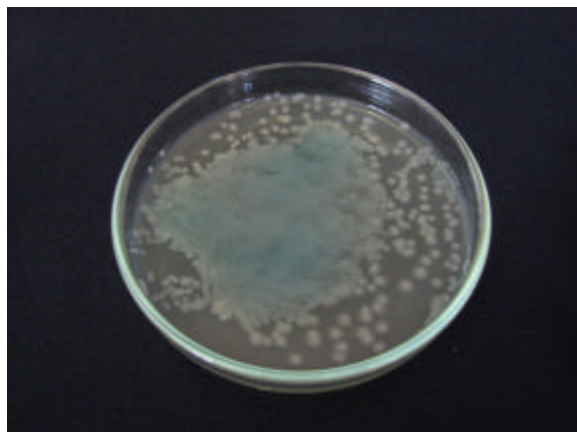
Anexo F: Fotos ilustrando a técnica de diluições seriadas e contagem em placas de unidades formadoras de colônia.



1. Ilustração da inoculação da amostra de sêmen em placa de Petri.



2. Placa de Petri ilustrando as UFCs possíveis de serem contadas



3. Placa de Petri ilustrando colônias impossíveis de serem contadas devido à aglomeração.



DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins de comprovação curricular, que o trabalho intitulado **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 (27 e 4°C)**, cujo autor é **Claudia da Cunha Barbosa**, e demais autores Victor Leão Hitzschky Madeira, Ricardo Parente Jucá, Ângela Cristina de Oliveira, Daniel Couto Uchoa, Lúcia Daniel Machado da Silva, foi recebido para tramitação e possível publicação na Revista Ciência Animal Brasileira.

Goiânia, 21 de novembro de 2007

Antônio José Siqueira Borges
Secretário Revista Ciência Animal Brasileira