



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

Alexandre Rodrigues Silva

**Criopreservação Do Sêmen Canino Diluído Em Tris:
Avaliação Morfológica, Funcional E De Suas Interações Com
Oócitos Homólogos**

**Fortaleza-Ceará
Dezembro de 2005**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

Alexandre Rodrigues Silva

**Criopreservação Do Sêmen Canino Diluído Em Tris:
Avaliação Morfológica, Funcional E De Suas Interações Com
Oócitos Homólogos**

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

Área: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva.

**Fortaleza-Ceará
Dezembro de 2005**

S586C

Silva, Alexandre Rodrigues.

Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: Avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos/Alexandre Rodrigues Silva. Fortaleza, 2005.

165p.; il.

Orientadora: Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva

Tese: Doutorado em Ciências Veterinárias – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Sêmen, 2. Cão, 3. Criopreservação. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária

CDD 636.08926

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Título do Trabalho: Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: Avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos

Autor (a): Alexandre Rodrigues Silva

Defesa em: 16/12/2005

Conceito obtido: Satisfatório “Com Louvor”

Nota obtida: 10 (Dez)

Banca Examinadora

Profª. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva
Orientadora

Profª. Dra. Maria Denise Lopes
Co-Orientadora/Examinadora

Profª. Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Examinadora

Prof. Dr. Airton Alencar Araújo
Examinador

Profª. Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos
Examinadora

*“Ando devagar, porque já tive pressa,
E levo esse sorriso porque já chorei demais.
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,
E só tenho a certeza de que muito pouco eu sei,
Eu nada sei.*

*Conhecer as manhãs e as manhãs, o calor das matas e das maçãs.
É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir,
É preciso chuva para sorrir.*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente.
Como um velho boiadeiro levando a boiada,
Eu vou levando os dias pela longa estrada eu vou,
Da estrada eu sou.*

*Todo mundo ama um dia, todo mundo chora.
Um dia a gente chega e no outro vai embora.
Cada um de nós compõe a sua história,
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz,
E ser feliz.”*

Almir Sater

DEDICATÓRIA

“Aos cães, e em especial aos meus cães Priscila, Guriá e Tê (in memoriam), que são a razão porque eu sigo essa estrada.”

Dedico

AGRADECIMENTOS

É incrível como escrever uma tese é difícil, porém mais incrível é perceber que escrever os agradecimentos é simplesmente uma tarefa ainda mais difícil. O receio de escrever bobagem, de exagerar no sentimento, ou de esquecer alguém importante, acaba por travar a nossa mente e simplesmente dá um branco. Seria mais fácil então generalizar e dizer que quero agradecer a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho. Isso não deixa de ser uma grande verdade, mas existem alguns agradecimentos especiais que não posso deixar de fazer:

A Deus ou qualquer que seja Seu nome, em qualquer língua ou religião, por cada uma das “pequenas coisas que valem mais” e que fazem parte de um todo maravilhoso.

Aos meus pais, Antonio Magomante Silva e Erenice Rodrigues Silva, e aos meus irmãos, Marcus Henrique, Herlon Victor e Janice Rodrigues Silva, por terem me dado uma base familiar estável para poder encarar essa jornada de peito aberto. A vocês, o meu sincero obrigado! Eu os amo muito!

À minha amiga, professora, orientadora e amiga, Dra. Lúcia Daniel M da Silva, que vem dividindo comigo essa trajetória acadêmica, desde a inciciação científica em 1996 até o dia de hoje. Acho que essa tese, mais do que um trabalho científico, representa a conclusão de uma grande parceria, pela qual eu vou ser eternamente grato. Desse modo, seriam poucas as palavras que representassem meu real agradecimento, mas eu tento aqui expressar, acima de tudo, o meu grande obrigado pelo exemplo de ser humano maravilhoso que ela demonstrou ser durante esse tempo.

À Dra. Maria Denise Lopes, que sempre bem disposta a ajudar, tão bem me acolheu em Botucatu-SP, onde possibilitou a realização de grande parte dos experimentos relatados nesta tese. O meu muito obrigado por ter sido naquele momento não apenas a minha orientadora, mas também uma amiga. Obrigado ainda por estar presente na minha defesa de tese, e por continuar sendo desde então uma amiga com a qual eu tenho a certeza de poder contar.

À Dra. Fabiana Ferreira de Souza, que tanto me ajudou em minha estada em Botucatu-SP para a realização de parte dos experimentos que compõem essa tese e por ter-se tornado uma grande amiga, com quem eu tenho a certeza de sempre poder contar.

Ao Dr. Airton Alencar de Araújo, pelo incentivo e pela ajuda em diversos momentos no decorrer da elaboração desta tese.

À Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos, pela ajuda no decorrer dessa caminhada e também por ter aceitado o convite para participar de minha banca de defesa de tese.

Ao Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas que tantas vezes me auxiliou com relação ao delineamento estatístico dos experimentos e também por ter-me permitido o uso de diversos equipamentos do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução-UECE.

Ao Dr. Ricardo Toniolli, pelo auxílio na elaboração do projeto que originou essa tese.

Ao Dr. José Ricardo de Figueiredo, por ter me representado o exemplo de como um profissional da área acadêmica deve ser.

À minha grande amiga Rita de Cássia Soares Cardoso, com quem desde a iniciação científica eu tenho o prazer de trabalhar e que muito me ajudou a superar alguns obstáculos e limitações que encontramos no decorrer desta jornada.

A Marcos Renato Franzosi Mattos e sua esposa Lucilene Simões-Mattos, meus colegas de mestrado e doutorado, e meus amigos do dia a dia, o meu muito obrigado por sua amizade de sempre, e por terem me ensinado que o mundo não se resume àquilo que se observa, que existe uma interdisciplinaridade entre as coisas, e que nada acontece sozinho ou por acaso.

Ao amigo Daniel Couto Uchoa, que mais que um amigo, mostrou-se ser um irmão nas horas alegres e nas horas difíceis, e particularmente com relação a essa tese, por ter disponibilizado os animais de seu canil, o Canil Grande Canafístula, para uso nos experimentos.

Às amigas Ana Kelen Felipe Lima e Ticiania Franco Pereira da Silva, cuja amizade e a certeza de estarem aí do lado significam muito pra mim.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução de Carnívoros – UECE: Janaína de Fátima Saraiva Cardoso, Iran Águila Aguiar, Carlos Gabriel Dias, Victor Leão Hitzschky Madeira, Leonardo Tavernezzì, Raimunndo Diones Carneiro, Daniel Falcão Menezes Brilhante, Camila Louise Ackerman, dentre outros que passaram pelo laboratório e aqueles que chegaram agora no finalzinho do trabalho.

Às colegas do Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres – UNESP: Maria Isabel Melo Martins, Viviane Helena Chirinéia e Christiane Barreto, e aos demais membros do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia da UNESP-Botucatu, pela grande acolhida e por ter-nos feito sentir como verdadeiros membros da casa.

À Dra. Berenice de Ávila Rodrigues, a quem tantas vezes eu pedi auxílio por e-mail e que tantas vezes me incentivou e me serviu de exemplo.

Ao Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu, por ter possibilitado a realização dos procedimentos de microscopia eletrônica.

À organização não-governamental Pró-Carnívoros, na pessoa do Dr. Ronaldo Gonçalves Morato, por ter nos cedido equipamentos essenciais para uso nos experimentos.

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa de estudos durante o doutorado.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro à realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UECE e a todos os seus professores e funcionários, pela acolhida e ensinamentos passados.

E, finalmente, àqueles que nos são fiéis em todas as horas, e que se doam para trabalhos como este, mesmo sem saber, e por isso e por tantas outras qualidades fazem jus ao título de “melhor amigo do homem”, a eles mesmos, aos Cães.

O meu muito obrigado e FORÇA SEMPRE!!!

RESUMO

A presente tese objetivou aprimorar uma metodologia de congelação de sêmen canino, utilizando o diluente Tris. Foi inicialmente avaliado o efeito da diluição espermática, no qual foram comparados o método de diluição baseado em uma concentração fixa de 200×10^6 espermatozoides/mL *versus* a diluição baseada no volume fixo a uma proporção de uma parte de sêmen para uma parte de diluente. Foi também testado o efeito da temperatura de adição do glicerol ao diluente, comparando-se 27°C com 4°C, bem como foi avaliada a adição de diluente ao sêmen após a descongelação. Foram ainda aplicados diferentes testes de avaliação seminal, no sentido de observar a relação entre eles e as interações entre espermatozoides e oócitos homólogos, sendo ao final também realizada uma análise conjunta de diferentes parâmetros morfológicos do sêmen. Para atingir os objetivos, o sêmen foi colhido por manipulação digital peniana, avaliado macro e microscopicamente, diluído conforme o tratamento proposto, congelado e armazenado em nitrogênio líquido. A descongelação se deu em banho-maria a 38°C. A partir das análises do sêmen descongelado, verificou-se que não existem diferenças entre os dois métodos de diluição testados, nem entre as temperaturas de adição de glicerol. Observou-se também que a adição de diluente ao sêmen após a descongelação não traz prejuízos e nem benefícios ao mesmo. No tocante às relações entre os testes, verificou-se que alguns parâmetros de motilidade espermática avaliados pela análise computadorizada de sêmen apresentam valor preditivo quanto às interações entre espermatozoides caninos descongelados e oócitos homólogos. Finalmente, a avaliação combinada de diversos parâmetros morfológicos mostrou que o procedimento de criopreservação induz diversas alterações à célula espermática, mas algumas destas são apenas detectadas através da microscopia eletrônica.

ABSTRACT

This thesis aimed to improve a canine semen freezing procedure using a Tris-based extender. First, the effect of the sperm dilution was evaluated by comparing the dilution method based on a fixed concentration of 200×10^6 spermatozoa/mL versus the dilution based in the fixed volume on a proportion of one part semen to one part extender. The effect of the temperature of glycerol addition to the extender was also tested, being compared 27°C with 4°C, as well as the addition of extender after thaw. Different semen evaluations were also applied in the sense of observing the relations among semen parameters and sperm-oocyte interaction in vitro. Finally, a combined evaluation of different morphologic parameters of semen was conducted. In order to reach the objectives, the semen was collected by digital manipulation, appraised grossly and microscopically, diluted according to the proposed treatment, frozen and stored in liquid nitrogen. The thawing was conducted at water-bath at 38°C. From the thawed semen analyses, it was verified that there are no differences between the two dilution methods tested, neither between the temperatures of glycerol addition. It was also observed that the addition of extender to the semen after thaw does not cause any damages or benefits to the semen. Concerning the relationships among the tests, it was verified that some sperm motility patterns evaluated by computerized analysis of semen present prognostic value on the interactions between thawed canine spermatozoa and homologue oocytes. Finally, the combined evaluation of several morphologic parameters showed that the cryopreservation procedure induces several alterations to the sperm cell, but some of these are just detected through the electronic microscopy.

SUMÁRIO

	Pág.
1. Introdução	01
2. Revisão de literatura	
a) Anatomo-fisiologia reprodutiva do macho canino	03
b) O espermatozóide canino	04
c) Histórico da criopreservação de sêmen canino	05
d) O diluidor Tris	06
e) A gema de ovo	08
f) O glicerol	10
g) Métodos de congelação e descongelação de sêmen canino	12
h) Métodos de avaliação seminal	14
Artigo de revisão: Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina	25
3. Justificativa	34
4. Hipóteses científicas	36
5. Objetivos	37
6. Capítulo 01: Comparison between different dilution rates on canine semen freezing using Tris-buffer with the addition of egg-yolk and glycerol	38
7. Capítulo 02: Influence of temperature for glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen	48
8. Capítulo 03: Prognostic value of canine frozen semen parameters on in vitro sperm oocyte interactions	55
9. Capítulo 04: Combined evaluation of multiple morphological parameters and fine structural appearance of canine frozen thawed semen	71
10. Discussão geral	
a) Sobre os animais utilizados no experimento	84
b) Efeito da diluição espermática	85
c) Temperatura de adição de glicerol	86

d) Motilidade espermática	87
e) Teste de termorresistência e efeito da adição de diluidor após a descongelação	90
f) Múltiplos parâmetros morfológicos do sêmen canino	91
g) Teste hipo-osmótico	93
h) Aparência ultra-estrutural espermática	94
i) Interação entre espermatozóides caninos congelados e oócitos homólogos	94
j) Efeito individual do cão	96
k) Considerações finais	97
11. Conclusões	99
12. Perspectivas	100
13. Referências bibliográficas	101
Anexos	
Anexo 01: Procedimento para teste de interação entre espermatozóides e oócitos	123
Anexo 02: Preparo das soluções utilizadas no teste de interação entre espermatozóides e oócitos	125
Anexo 03: Preparo das soluções utilizadas na avaliação de integridade de membrana espermática por microscopia de fluorescência	128
Anexo 04: Convite para participar do prêmio concedido pelo Instituto Royan em Tehran, Iran	129
Anexo 05: The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
ALH	Amplitude lateral head
Ave.	Avenue
BCF	Beat cross frequency
BHT	Hidroxí-tolueno butilado
BSA	Bovine serum albumine (Albumina sérica bovina)
C1	Concentração inicial
C2	Concentração final
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CASA	Computer Aided Semen Analysis
C-FDA	Diacetato de carboxi-fluoresceína
CLONE	Cryogenics Laboratory of New England
cm	Centímetros
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cool	Cooled semen
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Ext	Extended semen
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Fr	Fresh semen
Glyc	Glycerolized semen
HOST	Teste hipo-osmótico
HTR	Hamilton Thorn Researcher
IA	Inseminação artificial
IAIU	Inseminação Artificial Intra-Uterina
IAIV	Inseminação Artificial Intra-Vaginal
Km	Kilometer
L	Litro

LDL	Low density lipoproteins (Lipoproteínas de baixa densidade)
LH	Hormônio luteinizante
Lin	Linearity
LRC	Laboratório de Reprodução de Carnívoros
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mOsm	Miliosmol
ng	Nanogramas
°C	Graus Celsius
P	Probabilidade
PBS	Phosphate buffer saline
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
R	Coefficiente de relação
REPAS	Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres
RIA	Radio-imuno ensaio
s	Segundos
SAS	Statistical Analysis System
SD	Standard deviation
SQA	Semen quality analyzer
St.	Standardized
STR	Straightness
TEM	Transmission Electronic Microscopy
THAM	Trometamol
Thaw	Frozen/thawed semen
TTR	Teste de termorresistência
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USA	United States of America
V/V	Volume / Volume
V:V	Volume:Volume
V1	Volume inicial
V2	Volume final

VAP	Velocity average pathway
VCL	Velocity curvilinear
VSL	Velocity straight line
μm	Micrômetros

LISTA DE FIGURAS

Figuras

Pág.

Capítulo 01:

Fig. 1. Sperm motility of fresh (F), extended (Ext), cooled (Cool), glycerol-supplemented (Glyc) and frozen/thawed (Thaw) semen, submitted to standardized sperm concentration (St. concentration) or volume:volume extension (V:V extension – $P > 0.05$; Student's t test). 43

Fig. 2. Sperm vigor of fresh (F), extended (Ext), cooled (Cool), glycerol-supplemented (Glyc) and frozen/thawed (Thaw) semen, submitted to standardized sperm concentration (St. concentration) or volume:volume extension (V:V extension – $P > 0.05$; Mann-Whitney's test). 43

Capítulo 02:

Fig. 1. Progressive sperm motility of fresh (Fr), cooled (Cool) and frozen-thawed (Thaw) semen submitted to glycerol addition at 27 or 4°C ($p > 0.05$; Student's t test). 51

Capítulo 03:

Fig. 1: Oócito canino corado em Hoeschst 33258, apresentando espermatozóides (seta branca) ligados à sua zona pelúcida.

70

Figura 2: Espermatozóides caninos corados com carboxifluoresceína/iodeto de propídio, apresentando membrana plasmática intacta (corados em verde – seta branca) e não-intacta (corados em vermelho ou parcialmente corados – seta preta), visualizados por microscopia de fluorescência.

70

Capítulo 04:

Fig. 1: Fine-structural appearance of the head region of: A - slightly swollen plasmalemma (p) above the acrosomal region in a fresh canine spermatozoon; and the most common alterations observed in the head region of frozen canine spermatozoa: B – swollen plasmalemma (p) and undulant outer acrosomal membrane (am) and areas of vesiculation (arrow heads) in the acrosomal membrane; C - swollen plasmalemma (p) and loss of electro-dense acrosomal contents (arrows), 11500x; D – swollen (p) and ballooning (arrow heads) plasmalemma and vesiculation (arrows) in the acrosomal membranes.

78

Fig. 2: Transmission electron micrographs of the midpiece region in canine spermatozoa showing: A - longitudinal section illustrating intact plasmalemma (p), mitochondrial sheath (ms) and axonem (ax) in fresh semen; B - sagittal section illustrating swollen plasmalemma (p) and normal mitochondrial sheath (ms) and axonem (ax) in fresh semen; C- longitudinal section, and D -sagittal section demonstrating swollen plasmalemma (p) and abnormal appearance of 79 mitochondrial sheath (am), but intact axonem (ax), in frozen-thawed semen.

LISTA DE TABELAS

Tabelas

Pág.

Capítulo 01:

Table 1. Means and standard deviation of the characteristics of two ejaculates obtained from donor stud dogs. 43

Table 2. Sperm motility of thawed canine semen submitted to standardized sperm concentration or volume:volume extension and maintained at 38°C for 30 minutes. 44

Table 3. Sperm vigor of thawed canine semen submitted to standardized sperm concentration or volume:volume extension and maintained at 38°C for 30 minutes. 44

Table 4. Sperm morphology observed in canine fresh and frozen-thawed semen submitted to standardized sperm concentration or volume:volume extension. 45

Capítulo 02:

Table 1. Sperm morphology (%) of fresh and frozen-thawed canine semen after glycerol addition at 27 or 4°C evaluated immediately after semen collection or thawing and after 60 min, under dilution of one part semen to four parts extender (1:4). 52

Table 2 Acrosomal status (%) of fresh and frozen-thawed canine semen after glycerol addition at 27 or 4°C evaluated immediately after semen collection or thawing and after 60 min, under dilution of one part semen to four parts extender (1:4). 52

Table 3. Progressive sperm motility (%) of fresh and frozen-thawed canine semen after glycerol addition at 27 or 4°C in the undiluted (1:0) and diluted one part semen to four parts extender (1:4) samples, kept at 38°C for 120 min. 53

Capítulo 03:

Table 1. Sperm motility patterns observed in canine frozen/thawed semen (n=10) by Computer Aided Semen Analysis – CASA. 62

Table 2: Interactions among frozen-thawed canine sperm and homologue oocytes after 18h incubation – Percentage of oocytes bound, penetrated and interacted to spermatozoa and number of spermatozoa bound, penetrated or interacted to oocytes (n=10 canine frozen-thawed semen samples). 63

Capítulo 04:

Table 1. Sperm morphology analysis in fresh and frozen canine semen. 77

Table 2. Acrosomal integrity on canine fresh and frozen semen. 77

1. INTRODUÇÃO

Os canídeos são mamíferos caracterizados por dentes caninos pontiagudos, uma dentição para o regime onívoro e um esqueleto dimensionado para a locomoção digitígrada. Os canídeos do gênero *Canis* apareceram ao final da era terciária e adaptaram-se a diversos ecossistemas. Estudos arqueológicos recentes têm mostrado que o cão foi a primeira companhia não-humana dos homens (Morey, 1994), sendo um descendente direto do lobo cinzento (Wayne e Vila, 2001). Os mais antigos esqueletos de cães foram descobertos cerca de 30.000 anos depois do aparecimento do *Homo sapiens sapiens*, e foram encontrados sempre próximos aos acampamentos humanos, recebendo por isso a denominação *Canis familiaris* (Grandjean e Vaissaire, 2001). Desde então, o cão doméstico, universalmente conhecido como “o melhor amigo do homem”, tem sido criado com diversos propósitos que incluem a caça, o pastoreio, a companhia como animal de estimação, dentre outros.

A domesticação do cão pelo homem e sua manutenção como animal de estimação determinaram, nessa espécie, um processo de seleção gradativo e contínuo. A valorização desse processo ajudou a definir os diferentes padrões raciais hoje conhecidos (Rodrigues, 1997). Cada raça canina possui um padrão específico, constituído por um conjunto de características físicas e comportamentais que permitem ao animal desempenhar a função para qual a sua raça foi desenvolvida. Neste sentido, o homem tem, constantemente, tentado promover o melhoramento genético na criação de cães, para o qual faz uso de inúmeras ferramentas melhoradoras, dentre as quais podem ser destacadas as biotécnicas reprodutivas.

Dentre todas as biotécnicas, aquela que, atualmente, oferece os maiores subsídios para difusão de material genético na criação de cães é, sem dúvidas, a inseminação artificial em intrínseca associação à tecnologia de sêmen (Silva, 2001). A possibilidade de utilização do sêmen canino criopreservado abriu diversas fronteiras para a criação de cães, pois permite a troca de material genético de alto valor zootécnico entre localidades distantes, bem como o armazenamento desse material por períodos indefinidos (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989).

Apesar de os primeiros estudos relacionados à inseminação artificial e conservação de sêmen terem sido desenvolvidos, na espécie canina, por Lázaro Spallanzani ao final do século

XVIII (England, 1993), os estudos posteriores se concentraram, principalmente, na reprodução daqueles animais que tinham um interesse produtivo para o homem, como bovinos, pequenos ruminantes e suínos. Assim, após um longo vazio científico, em 1969, Seager obteve a primeira gestação canina, utilizando o sêmen criopreservado. Desde então, inúmeros estudos relacionados à reprodução canina têm sido conduzidos e, particularmente, nas últimas duas décadas, tem crescido o interesse nessa espécie. Esse maior interesse atual é atribuído, principalmente, a uma mudança conceitual dentro da medicina veterinária, onde a necessidade de especialização em determinadas áreas tem aumentado a cada dia, haja vista uma maior requisição dos criadores quanto a serviços especializados direcionados para seus animais de alto valor zootécnico ou afetivo.

Diversas metodologias têm sido preconizadas para a criopreservação do sêmen canino. Uma metodologia inicialmente desenvolvida para a conservação do sêmen caprino utilizando o diluente à base de água de coco (Nunes *et al.*, 1997) foi adaptada para a espécie canina utilizando-se o diluente Tris em trabalhos anteriores (Silva *et al.*, 1998; 2000; 2002cd; 2003). Entretanto, são ainda necessários alguns ajustes que proporcionem uma maior praticidade ao uso dessa metodologia, tais como a definição da temperatura de adição de glicerol e o estudo da diluição do sêmen. Além disso, esses trabalhos anteriores se baseavam em resultados avaliados apenas pela análise clássica da motilidade e morfologia espermática, sendo então aqui proposta a aplicação de testes mais avançados, como a microscopia eletrônica, análise computadorizada e teste de interação espermatozóides-oócitos.

No decorrer dos anos, diversos testes foram desenvolvidos para avaliar a qualidade das amostras seminais nas diferentes espécies. Porém, apenas recentemente as relações entre os mesmos estão sendo aos poucos desvendadas (Herrera *et al.*, 2004; Quintero-Moreno *et al.*, 2004). Em cães, existe ainda uma carência de estudos acerca dessas relações, uma vez que seria importante o conhecimento de um teste capaz de prever a fertilidade *in vitro* e/ou *in vivo* de uma amostra de sêmen.

A partir das informações apresentadas, segue-se uma revisão de literatura abordando diversos temas ligados à criopreservação de sêmen canino e oferecendo embasamento para os experimentos realizados nesta tese.

2. REVISÃO DE LITERATURA

a) Anátomo-fisiologia reprodutiva no macho canino

O sistema reprodutivo masculino é formado pelos testículos, epidídimos, vasos deferentes, glândulas acessórias e o pênis. Os testículos produzem espermatozóides e testosterona, assim como inibina, estrógeno e diversas proteínas. Os epidídimos proporcionam o ambiente para a maturação final dos espermatozóides e servem como um órgão de armazenamento para essas células. As glândulas acessórias produzem o plasma seminal e, no caso do cão, a única glândula presente é a próstata. O pênis, que se encontra protegido pelo prepúcio, consiste no órgão copulatório. Nos cães, o pênis possui algumas características peculiares como a presença de um osso peniano em seu interior e de um bulbo de tecido esponjoso erétil, que proporciona o “engate” com a fêmea durante a cópula (Getty, 1981, Johnston *et al.*, 2001).

O desenvolvimento das gônadas e da espermatogênese no cão é similar ao que ocorre em outros mamíferos. A diferenciação sexual ocorre entre os 27 e 34 dias após a concepção (Johnston *et al.*, 2001). A descida dos testículos ocorre entre duas e oito semanas após o nascimento e, por volta das 16 semanas, as células de Sertoli e as espermatogônias, que se multiplicam durante toda a vida, já estão presentes nos túbulos seminíferos (Kawakami *et al.*, 1991). Os espermátócitos e as espermátides são apenas observados após 20 e 22 semanas, respectivamente. Já os espermatozóides, podem estar presentes nos túbulos seminíferos após 26 semanas e, nos epidídimos, após 32 semanas (Mialot *et al.*, 1985a).

A espermatogênese é o processo pelo qual uma espermatogônia diplóide origina quatro células espermáticas haplóides. Esse processo é desencadeado nos túbulos seminíferos do testículo, a partir do início da puberdade no macho. No cão, a espermatogênese tem duração de oito a nove semanas, podendo ser observados 4,5 ciclos epiteliais nos túbulos seminíferos. A duração do ciclo do epitélio seminífero no cão é de 13,8 dias, sendo dividido em oito estágios. Já o trânsito espermático ao longo do epidídimo é de 14 dias (Foote *et al.*, 1972).

A puberdade no cão ocorre entre os nove e doze meses de idade, sendo marcada pelo aparecimento dos primeiros espermatozóides no ejaculado. Entretanto, alguns cães podem ser

férteis mesmo aos seis meses (Christiansen, 1988). A qualidade do sêmen melhora à medida que a maturidade sexual é atingida. O macho canino parece não apresentar influência da estacionalidade e é capaz de manter sua espermatogênese e a função testicular ao longo de todo o ano (Taha *et al.*, 1981; Martins, 2005).

Segundo Olar *et al.* (1983), a produção diária de espermatozóides no cão está entre 11,7 e 16,7 milhões de espermatozóides por grama de parênquima testicular. Esses mesmos autores sugeriram que a frequência de ejaculação não afeta a produção diária de espermatozóides, mas pode reduzir as reservas localizadas na cauda do epidídimo e ducto deferente em até 26% após seis a oito coletas de sêmen semanais. Em adição, Johnston *et al.* (2001) consideram que a concentração espermática normal para a espécie canina deva ser superior a 200×10^6 espermatozóides/mL.

b) O espermatozóide canino

O espermatozóide ou gameta masculino é uma célula altamente diferenciada e polarizada (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1993). Sua função na propagação genética é estabelecida através da penetração e conseqüente fecundação do gameta feminino (Rodrigues, 1997).

Foi Leeuwenhoek, em 1679, quem primeiro descreveu o espermatozóide canino (Oettlé, 1993). Mais tarde, com o desenvolvimento da microscopia, no século XIX, foi possível identificar as diferenças morfológicas específicas dos espermatozóides entre as diferentes espécies animais (Rodrigues, 1997). Segundo Bedford e Hoskins (1990), a diversificação morfológica espermática nas diferentes espécies animais poderia estar relacionada às suas respectivas formas de fecundação.

A célula espermática canina tem um comprimento total de $61,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$, comprimento de cabeça $6,1 \pm 0,04 \mu\text{m}$, 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 $50 \mu\text{m}$. A cabeça espermática é primariamente formada pelo DNA que compõe o núcleo e é recoberta, anteriormente, pelo acrossoma e posteriormente pelo envoltório pós-nuclear (Bartlett, 1962; Woodall and Johnstone, 1988). Segundo Dahlbon *et al.* (1997), existem marcadas diferenças entre indivíduos, com relação à morfometria da cabeça espermática na espécie canina.

O modelo básico da estrutura da membrana plasmática das células espermáticas segue a organização estrutural de uma bicamada de duplo folheto com fosfolipídios e proteínas associadas (Watson, 1995). Nos espermatozóides, o duplo folheto não é simplesmente uma bicamada passiva de membrana lipídica em que receptores recebem seus sinais moleculares específicos. Ele atua também como uma estrutura altamente especializada, assumindo um papel ativo na capacidade fertilizante, recebendo sinais e modificando-se ao longo do processo da espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração do oócito (Watson, 1995; Cunha, 2002).

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 seria o fator responsável pelo espermatozóide canino exibir uma resistência própria contra o choque térmico, uma vez que as células espermáticas do cão apresentam baixa sensibilidade às oscilações de temperatura.

c) Histórico da criopreservação de sêmen canino

Em 1776, Spallanzani observou que uma redução na temperatura diminuía reversivelmente a atividade metabólica do espermatozóide, possibilitando assim a sua armazenagem (England, 1993). Com a descoberta acidental da ação crioprotetora do glicerol por Polge *et al.* (1949), iniciou-se uma era de extenso desenvolvimento de metodologias de criopreservação de células espermáticas em diversas espécies, com o primeiro sucesso na congelação do sêmen canino notificado por Rowson em 1954 (England, 1993). Em 1969, Seager obteve a primeira gestação canina, utilizando o sêmen criopreservado. Atualmente, na maioria das notificações científicas (Rota *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 2000), a gestação tem sido alcançada utilizando-se um diluente à base de Tris-gema-glicerol.

No Brasil, a primeira notificação de sucesso em inseminação artificial (IA) com sêmen canino congelado foi realizada a pouco mais de 20 anos, tendo sido obtida uma ninhada de seis cães normais da raça Boxer (Vaske *et al.*, 1981). Desde então, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados a respeito do processamento de sêmen canino. Uma segunda gestação oriunda de IA com sêmen canino congelado veio a ser confirmada por ultrassonografia em 2000 através de um

trabalho realizado pelo Laboratório de Reprodução de Carnívoros (LRC) da Universidade Estadual do Ceará (UECE - Silva *et al.*, 2001), porém a cadela abortou devido à infecção por *Erlichia canis* e *Leishmania chagasi*. Recentemente, Santos (2004) apresentou resultados de 70% de nascimentos após inseminação artificial com sêmen congelado e diluído em Tris.

d) O diluente Tris

O sêmen apropriadamente diluído pode ser congelado por tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante quando reaquecido e utilizado em uma IA. Desse modo, faz-se necessário o uso de um bom diluente, o qual deve conter nutrientes como uma reserva de energia, servir como tampão ajustando as alterações do pH; promover uma pressão osmótica e concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos; proteger as células contra o choque térmico durante o processo de resfriamento e possuir crioprotetores que reduzam os danos às células espermáticas durante a congelação e posterior descongelação (Concannon e Battista, 1989).

Os primeiros experimentos para a preservação do sêmen canino por períodos curtos ou longos iniciaram-se com uma adaptação empírica de diluentes usados para o resfriamento e congelação do sêmen bovino com o uso dos tampões à base de citrato (Harrop, 1962), leite desnatado (Martin, 1963); cloreto de fosfato (Wales e White, 1963), Tris (Foote, 1964; Gill *et al.*, 1970) e lactose (Seager, 1969). A maioria dos grupos de pesquisa da atualidade tem utilizado o diluente Tris, o qual tem se mostrado superior a outros diluentes (Farstad, 1996; Silva *et al.*, 2000).

O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano - $H_2NC(CH_2OH)_3$) é uma substância facilmente solúvel em água, e disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Ele permanece estável em temperatura ambiente por diversos meses e é conhecido por não inibir diversos sistemas enzimáticos (Bates, 1962). Ele atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (McPhail e Goodman, 1984).

O tampão Tris tem sido utilizado em medicina recebendo a denominação de Trometamol (THAM), tanto como uma alternativa ao bicarbonato de sódio como em associação com o mesmo, para combater a acidose metabólica, uma vez que o Tris se difunde facilmente através de

espaços intracelulares (Sirieix *et al.*, 1997; Kallet *et al.*, 2000). Em pesquisas de biologia molecular, foi demonstrado que o Tris pode ser utilizado como estabilizador de pH de diversas reações (Bates, 1962), bem como na realização da eletroforese (Sendroy Jr *et al.*, 1962).

Sabe-se que a atividade metabólica do espermatozóide resulta na formação de íons H⁺, que poderiam levar à acidificação do meio. Desse modo, é necessário um mecanismo para a remoção desses íons, visto que a diminuição de pH poderia levar a uma redução da longevidade e da capacidade fertilizante da célula espermática (England, 1985). Nesse sentido, Davis *et al.* (1963) foram os primeiros a descrever a utilização do tampão Tris para a conservação do sêmen de um mamífero, no caso, da espécie bovina. No ano seguinte, Foote (1964) adaptou o uso do diluente à base de tampão Tris associado ao citrato para a preservação do sêmen na espécie canina. Desde então, o Tris tornou-se o diluente mais utilizado para a congelação do sêmen canino. De fato, Kober (1985 - apud Rodrigues, 1997) reportou que o Tris não apenas apresenta atividade tamponante, mas que também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação de sua energia.

Para o preparo do diluente Tris, usualmente, realiza-se a adição de uma hexose (C₆H₁₂O₆), como uma fonte exógena de substrato energético para o espermatozóide (England, 1993). A célula espermática dos mamíferos é capaz de obter a energia necessária para a manutenção de sua motilidade através da via glicolítica ou do ciclo de Krebs (Rigau *et al.*, 2002). Sabe-se que o plasma seminal da espécie canina, normalmente, não possui grandes quantidades dos açúcares frutose e glicose (Rigau *et al.*, 2001). Entretanto, estes são os açúcares mais comumente utilizados para o preparo do diluente Tris (Silva *et al.*, 2002c; Martins, 2005). Rigau *et al.* (2001) demonstraram que esses açúcares atuam em mecanismos diferentes na célula espermática, sendo que a frutose lhe confere uma motilidade mais rápida e linear. Posteriormente, os mesmos autores (Rigau *et al.*, 2002) demonstraram que a frutose parece ser mais sensível à atividade da enzima hexoquinase, apresentando assim um efeito mais significativo sobre o metabolismo da célula espermática, quando comparada à glicose.

Silva *et al.* (2002c) congelaram o sêmen de cães na ausência de glicerol ou gema de ovo, utilizando um diluente formado apenas por Tris-frutose-ácido cítrico, e demonstraram que 11% dos espermatozoides foram capazes de apresentar motilidade após a descongelação. Esses autores atribuíram a sobrevivência desses espermatozoides a uma ação crioprotetora da frutose, sugerindo que o aumento de sua concentração no meio poderia possivelmente levar a melhores

resultados pós-descongelamento. Finalmente, vale salientar que todos os derivados de açúcares que participam da via glicolítica são isômeros D (Nelson e Cox, 2000). Desse modo, na composição do diluente à base de Tris, sugere-se o uso da D-frutose (Silva *et al.*, 2002c).

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico - $C_6H_8O_7$) é outra substância que entra na composição do diluente Tris (Silva *et al.*, 2002c). Ele é um ácido fraco inorgânico, facilmente encontrado nos citrinos, ou seja, nos frutos cítricos. Em temperatura ambiente, ele apresenta-se como um pó cristalino branco, podendo existir na forma anidra ou na monohidratada, a qual apresenta uma molécula de água para cada molécula de ácido cítrico (Wikipedia, 2005). No caso do diluente Tris, a forma utilizada é a monohidratada (Silva *et al.*, 2002c). Por sua conhecida ação anti-oxidante, o ácido cítrico tem sido utilizado como um conservante natural. Em bioquímica, é marcada a sua atuação no ciclo de Krebs, importante via da respiração celular que ocorre nas mitocôndrias. Além disso, em algumas soluções, o ácido cítrico é capaz de servir como doador de prótons, produzindo o citrato, que é largamente conhecido por atuar na estabilização de pH (Wikipedia, 2005). Assim, é provável que o ácido cítrico contribua para a preservação da célula espermática auxiliando na manutenção do pH do diluente e atuando como anti-oxidante, bem como no mecanismo de respiração celular.

e) A gema de ovo

A gema de ovo de galinha tem sido adicionada ao tampão Tris por proteger a membrana plasmática, restaurando os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento inicial do sêmen (Watson e Plummer, 1985; Hammerstedt *et al.*, 1990). Acredita-se que essa proteção possa ser devido à presença de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina. Durante o choque térmico, as lipoproteínas interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propiciam a proteção. (Bouchard *et al.*, 1990). Segundo Foulkes (1977), a gema de ovo previne também a liberação da enzima hialuronidase pela célula espermática.

Para a preservação do sêmen canino, uma variedade de concentrações de gema de ovo tem sido utilizada. Visto que a mesma também tem uma capacidade de tampão, sua quantidade no meio varia de acordo com a capacidade tamponante dos outros componentes do diluente (Farstad, 1996). Nesse contexto, a maioria dos autores utiliza concentrações de gema em torno

de 20% no diluente (Farstad e Andersen-Berg, 1989; Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Silva, 2001; Martins, 2005).

Moura (2000) comparou as gemas de ovo de galinha e codorna como protetores de resfriamento na congelação do sêmen de cães e observou não existirem diferenças entre as mesmas quanto à conservação da motilidade, vigor e morfologia espermática após a descongelação. Assim, é sugestivo que a gema de ovo de codorna, que é bastante rica em ácido ascórbico e outras vitaminas, possa também ser utilizada na congelação do sêmen canino.

Apesar de seus efeitos benéficos, a gema apresenta alguns inconvenientes, como a possibilidade de transmissão de doenças (Silva *et al.*, 2002c). Além disso, ela facilita o processo de oxidação sobre os espermatozoides caninos, podendo promover a peroxidação dos lipídios insaturados, à qual o espermatozóide canino é bastante sensível (Davies, 1982 apud Rodrigues, 1997). Por essas razões, pesquisas visando sua substituição por outros lipídios sintéticos e purificados foram conduzidas e observaram que os análogos do hidroxitolueno butilado (BHT) são interessantes substitutos para a gema, por também protegerem a membrana plasmática da injúria do choque térmico (Farstad, 1996). Além disso, foram também conduzidas pesquisas na ausência da gema de ovo, onde se utilizando um diluente composto pelo tampão Tris acrescido apenas de glicerol, foi verificada uma motilidade espermática pós-descongelação de 35% (Silva *et al.*, 2002c).

Diversos autores propuseram que a fração de baixa densidade da gema de ovo, principalmente composta por lipoproteínas de baixa densidade (LDL), seria a principal responsável pela proteção que a gema de ovo confere às células espermáticas (Folkes, 1977; Graham e Foote, 1987). Esses autores sugerem que as LDL aderem às membranas celulares durante os procedimentos de congelação e descongelação e conferem proteção a essas membranas. Entretanto, a maneira como isso ocorre permanece por ser elucidada. Estudos recentes mostraram ser possível a purificação das LDL, permitindo sua utilização em substituição à gema de ovo integral (Moussa *et al.*, 2002). Varela Jr. *et al.* (2004) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de LDL purificada adicionada ao diluente Tris para a refrigeração do sêmen do cão a 5°C e observaram que concentrações entre 6 e 10% de LDL são tão eficientes quanto o uso de 20% de gema de ovo integral. Entretanto, a literatura ainda é escassa de informações quanto ao uso das LDL na tecnologia de sêmen de cães.

Além de sua ação em proteger a membrana espermática, a gema de ovo é também conhecida por servir como uma fonte protéica para o diluente (Santos, 2004). Outras substâncias têm sido também utilizadas com este mesmo propósito, tais como o leite desnatado (Rota *et al.*, 2001) e a albumina sérica bovina – BSA (Rodrigues, 1997; Sirivaidiapong *et al.*, 2000; Santos, 2004).

Já foi também descrita a incorporação de detergentes derivados do dodecil sulfato de sódio (SDS) ao diluente Tris, tais como o Equex STM (Peña, 2000) e o Orvus ES (Tsutsui *et al.*, 2000). Segundo Peña (2000), o SDS é um detergente aniônico do grupo alquil, cujo efeito protetor sobre a célula espermática não está ainda totalmente compreendido. Porém, acredita-se que ele solubilize as lipoproteínas da gema de ovo e aumente deste modo seu potencial de proteção à célula espermática. Esse mesmo autor alertou ainda para o fato de que uma exposição prolongada dos espermatozoides ao SDS poderia conferir um excesso de fluidez à sua membrana plasmática.

f) O glicerol

Para se obter sucesso com a criopreservação de sêmen, faz-se necessária a adição de substâncias denominadas crioprotetores, cuja presença é capaz de melhorar a sobrevivência celular após os processos de congelação e descongelação. Os agentes crioprotetores pertencem a dois grupos: 1) aqueles que penetram nas células, como o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etileno-glicol e o metanol; 2) aqueles que permanecem no meio extracelular, como as proteínas, os açúcares e o polivinil-pirrolidona (England, 1993).

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$), um álcool polihídrico altamente permeável, é o crioprotetor mais empregado na congelação de sêmen nas diferentes espécies (Silva *et al.*, 2003). Esta substância possui a capacidade de penetrar através das membranas celulares. Parks e Graham (1992) sugeriram que o glicerol penetra a célula através da difusão passiva, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma. Graham (1996) verificou que a difusão do glicerol é de 30 a 60 vezes mais lenta que a da água. Nas espermátides de ratos foi identificada a presença de um canal protéico específico para a penetração do glicerol, denominado Aquaporina 7 (Ishibashi *et*

al., 1997), o qual se acredita existir também em células espermáticas das demais espécies, haja vista a grande similaridade entre as mesmas.

Apesar da larga utilização, o mecanismo de ação do glicerol no interior da célula não está ainda totalmente elucidado (Curry, 2000). Sabe-se que o mesmo inicialmente ocasiona um estresse osmótico à célula espermática, impedindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (Watson, 2000). Os efeitos protetores do glicerol são representados por suas propriedades coligativas, pela diminuição do ponto de congelamento e pela conseqüente redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra (Lovelock e Polge, 1954).

McLaughlin *et al.* (1992), Curry (2000) e Holt (2000) reportaram que o glicerol exerce efeitos tóxicos sobre os espermatozoides, como alterações físico-químicas que podem levar à ruptura da membrana plasmática, à remoção de importantes proteínas membranárias, ou originar danos acrossomais. O glicerol pode ainda contribuir para a alteração das propriedades da membrana celular através da indução de modificações na estabilidade da sua estrutura lipídica e de alterações na sua permeabilidade à água. A fusogenicidade da membrana e sua resposta ao sinal de transdução poderiam ser também afetadas, contribuindo para a redução da longevidade e aceleração da capacitação espermática (Watson, 1995).

Para Watson (1979), a concentração ideal de glicerol no diluente seria aquela em que há uma predominância de seus efeitos protetores sobre os efeitos tóxicos. Essa concentração pode ser influenciada por outros componentes do diluente, pelo padrão de resfriamento e pelos métodos de congelamento e descongelamento. No entanto, os principais fatores determinantes seriam ainda as características seminais de cada espécie.

Vários pesquisadores sugerem o uso de concentrações finais de glicerol entre 2 e 16% para a criopreservação do sêmen canino, dependendo da composição do diluente utilizado. Ravaszova *et al.* (1996) testaram o efeito de 4, 6 e 8% de glicerol no diluente à base de Tris e observaram que as concentrações de 4 e 6 % de glicerol são as mais apropriadas em preservar a motilidade e o vigor espermático. Do mesmo modo, Silva *et al.* (2002d) testaram as concentrações de 4, 6 e 8% de glicerol para a congelamento do sêmen canino e verificaram que a morfologia espermática era melhor preservada, quando utilizada a concentração de 6%.

O efeito da temperatura de adição de glicerol tem sido investigado em estudos de criopreservação do sêmen canino. Os agentes crioprotetores penetrantes, particularmente o glicerol, protegem a célula da crioinjúria durante a fase de cristalização que ocorre entre -6° e -10°C . Dessa forma, não pareceria ser lógico adicionar o glicerol a temperaturas superiores a 30°C (Colas, 1975). No entanto, Andersen (1975) realizou a adição de um diluente glicerolizado ao sêmen a 37°C e obteve bons resultados após inseminação artificial. Já Peña *et al.* (1998) não encontraram diferenças entre a adição de glicerol ao sêmen a 37° ou a 4°C . Em todo caso, existe ainda uma carência de estudos conclusivos com relação à temperatura ideal para a adição do glicerol ao sêmen do cão.

No tocante à forma de adição, Fontbonne e Badinand (1993b) não verificaram diferenças na qualidade do sêmen canino após a descongelação entre a adição do glicerol de uma única vez em relação à adição fracionada, tanto à temperatura ambiente (25°C) quanto a 5°C . Ademais, Silva *et al.* (2003) compararam a adição única e fracionada do glicerol ao sêmen, na temperatura de 4°C e não observaram diferenças entre as mesmas.

Tal qual em outras espécies, a ausência de glicerol durante a criopreservação do sêmen canino resulta em uma significativa redução na sobrevivência após a descongelação. Olar *et al.* (1989) verificaram que a motilidade estimada do espermatozóide após a descongelação em diferentes diluentes na ausência de glicerol fica em torno de 11%. Já Silva *et al.* (2002c) obtiveram motilidade de 20% no uso do diluente Tris acrescido apenas de gema de ovo, o que comprova a necessidade da adição do glicerol.

g) Métodos de congelação e descongelação de sêmen canino

Diversas metodologias têm sido descritas para a congelação do sêmen de cães e variam de acordo com o diluente, protetores de resfriamento e agentes crioprotetores empregados, preconizando o uso de diferentes velocidades de congelação. Em todas elas, busca-se minimizar o dano causado ao espermatozóide pelo processamento, visando recuperar um máximo possível de espermatozóides viáveis (Strom *et al.*, 1997).

Dentre os diversos métodos existentes, o mais usual é o descrito por Andersen (1975). Neste método, foi realizada a diluição do sêmen a 37°C em Tris acrescido de gema de ovo e

glicerol. Em seguida, foi procedido um período de equilíbrio de três horas, seguido do envase em palhetas plásticas e a exposição aos vapores de nitrogênio para congelação. Atualmente, esse método tem servido como base para inúmeros trabalhos onde têm sido realizadas pequenas modificações, alcançado excelentes resultados *in vitro* (Strom *et al.*, 1997) e *in vivo* (Ferguson *et al.*, 1989; Linde-Forsberg *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 2000).

O método CLONE foi desenvolvido para aplicação comercial pelo Cryogenic Laboratories of New England, Inc. (CLONE) e tem sido utilizado desde 1983. Ele consiste na diluição do sêmen à temperatura ambiente em um diluente denominado Clone A. Procede-se então o período de equilíbrio de uma hora, a adição do diluente Clone B, o envase e a exposição aos vapores de nitrogênio. Esse método tem também proporcionado motilidade pós-descongelação em torno de 70% (Strom *et al.*, 1997) e taxas de concepção em torno de 86,4% após inseminação (Govette *et al.*, 1996).

Em 2000, Silva *et al.* adaptaram a metodologia de congelação do sêmen de caprinos com o diluente à base de água de coco (Nunes *et al.*, 1997) para a congelação do sêmen de cães com o diluente Tris. Estes autores observaram que este método é de grande praticidade e é mais rápido que o método de Andersen, por não requerer um tempo de equilíbrio após a adição de glicerol. No decorrer dos anos, diversos ajustes foram realizados nessa metodologia, tais como a determinação da concentração ideal de glicerol no diluente (Silva *et al.*, 2002d) e da forma ideal para a adição do glicerol ao diluente (Silva *et al.*, 2003). Entretanto, o ajuste final de alguns detalhes, tais como a temperatura ideal para adição do glicerol, bem como a taxa de diluição mais adequada, poderia conferir maior praticidade a esse método. Além disso, os testes realizados com o sêmen descongelado após aplicação desse método até então se concentraram na avaliação clássica do sêmen, sendo sugestiva a realização de análises mais sofisticadas.

De maneira análoga ao processo de congelação espermática, existem vários protocolos preconizando diferentes temperaturas e velocidades de descongelação para o sêmen canino. Badinand *et al.* (1993) descongelaram amostras de sêmen a 37 °C por 45s e consideraram esse método mais seguro, pois o tempo de permanência em temperaturas altas poderia ser crítico e de influência letal sobre a viabilidade dos espermatozóides. Do mesmo modo, Silva *et al.* (1998) sugerem que a temperatura de 37°C por 60s promove uma menor porcentagem de alterações morfológicas espermáticas do que a de 50°C por 30s.

Por outro lado, Ivanova-Kicheva *et al.* (1995), comparando os processos de descongelamento a 37 °C por 8s e 55 °C por 5s, observaram que a motilidade espermática foi melhor preservada a 55 °C e sugeriram que a elevação da temperatura de descongelamento reduz o dano osmótico nas células, além de prevenir a formação de cristais. Além disso, Chirinéa (2004) e Martins (2005) utilizaram um método de descongelamento a 75°C por 8s para o sêmen de cães e obtiveram excelente qualidade espermática pós-descongelamento. Usualmente, este processo é realizado sob imersão em banho-maria a temperaturas que variam de 37 °C (Linde-Forsberg, 1991) a 75 °C (Olar *et al.*, 1989).

h) Métodos de avaliação seminal

i) Análise da motilidade espermática: Segundo Derivaux (1980), a avaliação da motilidade espermática é definida como o percentual de espermatozóides móveis em uma amostra e sua intensidade de movimento. Embora a relação entre a motilidade e a capacidade fecundante do espermatozóide canino não esteja totalmente elucidada, atualmente, a maioria dos pesquisadores ainda utiliza a motilidade como o principal parâmetro para a avaliação de diluentes, crioprotetores e técnicas de criopreservação de sêmen canino (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2003). Seager e Fletcher (1972) ressaltam que a avaliação da motilidade espermática deve ser avaliada imediatamente após a coleta ou descongelamento do sêmen, com o auxílio da microscopia óptica. Em seguida, deve-se avaliar o *status* da motilidade ou vigor espermático, que é a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozóides móveis. Para tanto, faz-se uso de escalas que vão de 0 a 5, cujas classificações variam conforme o autor (Herman e Swanson, 1941; Platz e Seager, 1977; Christiansen, 1988).

Nothling *et al.* (1997) observaram que a taxa de implantação em cadelas inseminadas com sêmen congelado estaria correlacionada positivamente com o número de espermatozóides móveis após a descongelamento, sendo que a motilidade apresentaria então um melhor indicativo de fertilidade do que a verificação da morfologia e da integridade do acrossoma. No entanto, esses autores ressaltam que, além da qualidade seminal, fatores como a detecção do momento ideal para a realização da inseminação, podem também influenciar nos resultados de fertilidade.

Apesar da larga utilização, a motilidade espermática não é um parâmetro totalmente confiável para se predizer a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen. A presença de

espermatozoides imóveis não implica que os mesmos estejam mortos. Em outras espécies já foi comprovada a presença de espermatozoides estruturalmente intactos, porém imóveis, após a descongelamento (Janukauskas *et al.*, 1995), sendo que os mesmos poderiam voltar a apresentar movimento através da adição de substâncias estimulantes, tais como a cafeína (Larsson e Einarsson, 1976). Por outro lado, espermatozoides que apresentem uma motilidade de boa qualidade após a descongelamento podem ser incapazes de fertilizar um oócito caso apresentem danos acrossomais (Strom *et al.*, 1997).

Apesar da avaliação da motilidade espermática não poder ser usada como uma mensuração dos espermatozoides vivos e mortos na amostra, ela fornece a informação de um fator que é necessário para a capacidade fertilizante do espermatozoide, pois a motilidade é a manifestação da sua competência estrutural e funcional (Peña Martinez, 2004). Embora na espécie canina já tenham sido realizados estudos que mostrem que a motilidade está geralmente relacionada à integridade de membrana plasmática (Kumi-Diaka, 1993) e à morfologia (Ellington *et al.*, 1993), a existência de correlações entre motilidade espermática e fertilidade *in vitro* ou *in vivo* permanece por ser melhor esclarecida. E, mesmo em outras espécies, essas relações entre motilidade e fertilidade são ainda bastante conflitantes (Sanchez-Partida *et al.*, 1999; Tardif *et al.*, 1999).

ii) Análise computadorizada: A análise computadorizada (CASA) foi proposta para suplantarmos o obstáculo de subjetividade nas análises de sêmen e vem sendo utilizada em diversas espécies animais, incluindo o cão (Iguer-Ouada and Verstegen, 2001). Segundo Rijsselaere *et al.* (2005), os resultados de motilidade verificados através da CASA estariam correlacionados aos avaliados subjetivamente pela microscopia óptica.

Para a aplicação da CASA, já foi descrito o uso de diversos aparelhos. Dentre estes, podem ser destacados o Hamilton Thorn (HTR analyzer, Hamilton Thorn Research, Beverly, EUA – Iguer-Ouada, 2001), o Cell Soft Computer Videomicrography System (Cryo Resources Ltd, Nova York, EUA – Gunzel-Apel *et al.*, 1993), o SM-Cell Motion Analysis (Stroemberg-Mika, Bad Feilnbach, Alemanha – Gunzel Apelt *al.*, 1993) e o Sperm Quality Analyser (SQA II, Medical Electronic Systems LTD. Tirat Carmel, Israel – Rijsselaere *et al.*, 2002).

Günzel-Apel *et al.* (1993) foram os primeiros a descrever a análise do sêmen canino com a CASA. Essa análise permite uma avaliação objetiva e precisa não somente sobre a proporção

de células móveis em uma amostra de sêmen, mas também sobre a qualidade do movimento das mesmas. As trajetórias do espermatozóide, individualmente, são determinadas pela função flagelar, onde características como velocidade, frequência de batimento flagelar e amplitude irão corretamente refletir a condição fisiológica de cada célula (Peña, 2000). Os dados obtidos através desse método correspondem a centenas de mensurações espermáticas individuais, fornecendo informações sobre a qualidade média da motilidade em uma amostra de sêmen (Günzel-apel *et al.*, 1993) e também sobre diferentes subpopulações espermáticas coexistindo na amostra (Peña Martínez, 2004).

A CASA permite ainda uma análise morfométrica dos espermatozoides, proporcionando análises das dimensões da célula espermática e avaliação de sua morfologia. Rijsselaere *et al.* (2004) adaptou o Metrix Oval Head Morphology Software (Metrix) para uso no Hamilton Thorn, e validou os parâmetros de dimensão e morfologia espermática para o cão. Entretanto, esses mesmos autores citam que esses dados morfométricos são ainda de difícil interpretação, uma vez que Dahlbon *et al.* (1997) comprovaram que existem marcadas diferenças individuais entre os cães com relação à morfometria de suas células espermáticas.

iii) Teste de termorresistência: Esse teste corresponde à verificação *in vitro* da longevidade espermática através de repetidas observações da motilidade pós-descongelação em tempos variados durante a incubação em temperaturas similares à uterina. Acredita-se que o mesmo possa ser considerado um indicador razoável da fertilidade, visto que parcialmente mimetizaria uma situação *in vivo* (Peña *et al.*, 1998). Strom *et al.* (1997) reportam que o teste de termorresistência (TTR) tem sido mostrado como um teste laboratorial seguro para predizer o potencial fertilizante do sêmen humano e que, tal qual na espécie suína, poderia dar uma melhor indicação da capacidade fertilizante do espermatozóide canino do que a simples estimativa da motilidade espermática imediatamente após a descongelação. Associado a esses fatos, na espécie bovina, o teste de termorresistência confere uma melhor estimativa da fertilidade do que a simples estimativa imediata da motilidade após a descongelação (Larsson e Einarsson, 1976).

Entretanto, Concannon e Battista (1989) sugerem que a termorresistência espermática após a descongelação na espécie canina seja inferior à das outras espécies e que o teste de termorresistência deve ser utilizado apenas para a avaliação de técnicas de congelamento. Em adição, Olar (1984) sugere que a avaliação da motilidade imediatamente após a descongelação

pode ser mais importante do que a sobrevivência espermática após um longo período de incubação.

Silva (2001) afirma ser necessário um rigoroso controle da temperatura de incubação para a realização desse teste, uma vez que estes autores incubaram o sêmen canino descongelado em temperaturas que oscilavam entre 37 e 39 °C e verificaram uma motilidade espermática de apenas 2,5% após 120 minutos. Já Strom *et al.* (1997) reportaram uma motilidade de 22% para o sêmen descongelado após 180 minutos, no uso do mesmo diluente, sendo, porém mantido a uma temperatura fixa de 37 °C. Por outro lado, mesmo no uso de uma temperatura fixa de 39 °C, Peña *et al.* (1998) obtiveram apenas 6,8% de motilidade após 4 horas de incubação no uso do mesmo diluente. Em adição, Peña e Linde-Forsberg (2000b) observaram que a adição da pasta Equex STM ao diluente Tris melhorava consideravelmente os resultados de termorresistência, sendo verificados 20% de espermatozóides móveis decorridas 7 horas da descongelação.

Strom *et al.* (1997) afirmam que uma baixa termorresistência não estaria necessariamente associada com baixa fertilidade na espécie canina. Esses autores encontraram alta porcentagem de motilidade espermática após a descongelação (74%), mas obtiveram baixa termorresistência (20% após uma hora de incubação a 37 °C) ao utilizar um método comercial para a congelação do sêmen de cães. Entretanto, após inseminação artificial por via intra-uterina, foi obtida uma taxa de 85% de fertilidade. Assim, a existência de uma correlação entre longevidade espermática após a descongelação e as taxas de fertilidade *in vivo* em cães merece ainda maiores estudos.

iv) Avaliação da morfologia espermática: Um outro parâmetro importante a ser avaliado é a morfologia espermática. Até o momento, ainda não foi descrita a evidência de uma relação entre a morfologia espermática e a fertilidade no cão. Os poucos trabalhos que evidenciam uma possível relação ainda são conflitantes (Oetlé e Soley, 1985; Renton *et al.*, 1986; Plummer *et al.*, 1987). Oetlé (1993) relata que à medida que o percentual de espermatozóides anormais aumenta, a fertilidade é reduzida, sendo observado que quando a proporção de espermatozóides morfolologicamente normais está abaixo de 60%, a fertilidade é adversamente afetada.

Para possibilitar a avaliação da morfologia espermática, pode-se fazer uso de diversos corantes, tais como: Eosina-Nigrosina (Dott e Foster, 1972), Spermac (Oetlé, 1993), Rosa de Bengala (Rodrigues, 1997), Giemsa (Cardoso *et al.*, 2003), Hematoxilina-Eosina (Silva *et al.*, 2003). Segundo Dott e Foster (1972), a coloração de Eosina-Nigrosina permitiria a distinção de

espermatozoides vivos e mortos, uma vez que a Nigrosina ofereceria um plano de fundo para a distinção entre células eosinofílicas e não-eosinofílicas, que representariam os espermatozoides mortos e vivos, respectivamente.

O corante Rosa de Bengala (Rodrigues, 1997) permite não apenas a visualização da morfologia espermática, mas também a avaliação da integridade do acrossoma. O acrossoma é uma vesícula contendo várias enzimas hidrolíticas incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas, envolvidas no processo de fecundação (Hafez, 1995), desempenhando um papel crucial na função espermática. Sirivaidyapong *et al.* (2000) relataram que além da observação da motilidade, deve também ser avaliada a integridade do acrossoma, uma vez que a composição de diversos diluentes para o sêmen do cão, incluindo aqueles baseados em Tris, promoveriam um aumento na incidência de reação acrossômica ao final dos processos de congelamento e descongelamento.

Diversas classificações foram propostas para a morfologia espermática. Seager (1986) sugere a classificação das alterações morfológicas espermáticas como: primárias, quando relacionadas a problemas oriundos da produção espermática no testículo; ou secundárias, quando relacionadas aos problemas causados durante a maturação espermática no epidídimo, ou oriundas dos processos de manipulação do sêmen, como diluição, resfriamento, congelamento ou descongelamento. Oettlé (1993) sugere a classificação de acordo com os danos que as alterações causam à função espermática, nomeando tais alterações como defeitos maiores ou menores. Já outros autores preferem classificar as alterações de acordo com a região espermática afetada, sendo eles defeitos de cabeça, peça intermediária ou cauda (Silva *et al.*, 2003).

v) Uso de sondas fluorescentes: A integridade de membrana plasmática não é importante apenas para o metabolismo espermático, mas também para o sucesso da fertilização do oócito. A coloração com sondas fluorescentes tem como objetivo avaliar a integridade estrutural da membrana plasmática da célula espermática (Souza, 2003).

Em 1986, Garner *et al* descreveram o uso de duas substâncias fluorescentes: o diacetato de carboxifluoresceína e o iodeto de propídio, para verificar a integridade de membrana de espermatozoides de bovinos, através de um citômetro de fluxo. Posteriormente, Harrison e Vickers (1990) modificaram essa técnica e mostraram ser possível a observação da integridade da membrana através da microscopia de fluorescência.

O diacetato de carboxifluorosceína (CFDA) é uma solução não fluorescente que penetra o ambiente celular e é, rapidamente, convertida em carboxifluorosceína pelas esterases intracelulares. A carboxifluorosceína é uma solução altamente fluorescente não permeável que é mantida no meio intracelular na presença de uma membrana plasmática intacta, apresentando a coloração verde. Por outro lado, o iodeto de propídio (PI) tem a capacidade de corar o DNA de células que estão mortas ou têm sua membrana danificada, produzindo uma coloração vermelho fluorescente quando excitada (Peña *et al.*, 1998).

Existem diversos outros corantes fluorescentes utilizados para avaliar não apenas a integridade da membrana plasmática, mas também os diversos estágios da reação acrossômica. Dentre os mesmos, podem ser citados: o SYBR-14, o carboxi-SNARF, a calceína-AM associada ao homodímero etídio, e o Hoeschst 33258 (Rijsselaere *et al.*, 2005).

As colorações fluorescentes permitem a avaliação espermática tanto através da microscopia de fluorescência, quanto da citometria de fluxo. A vantagem da citometria é a possibilidade de contagem de um maior número de células e uma avaliação mais objetiva dos parâmetros seminais. Em todo caso, Peña (2000) demonstrou haver uma alta correlação entre os resultados avaliados por ambas as técnicas.

vi) Teste hiposmótico: A habilidade do espermatozóide bovino e humano em se alterar na presença de meios hipotônicos foi demonstrada por Drevious e Eriksson (1966). Esses autores observaram que esta resposta osmótica estava associada com o encurvamento e o enrolamento da cauda dos espermatozoides e que o desenrolamento ocorria quando o espermatozóide retornava a um meio isosmótico. Essas modificações foram largamente confirmadas por outros pesquisadores (Foote e Bredderman, 1969; Mahi-Yanagimachi, 1976). Van Der Vem *et al.* (1986) demonstraram que a resposta espermática às alterações osmóticas está relacionada à presença de uma membrana celular funcional. Segundo Drevious e Eriksson (1966), o aumento no volume sofrido pelo espermatozóide exposto a condições hiposmóticas ocorre com um mínimo de aumento na sua área superficial. Assim, após a expansão da membrana plasmática da sua cauda, os filamentos axiais flexíveis iniciam um processo de encurvamento ou enrolamento, conferindo uma aparência mais esférica à célula espermática. Segundo Souza (2003), acredita-se que a membrana plasmática da região da cabeça do espermatozóide tenha o mesmo

comportamento que a da cauda, porém não é possível essa observação pelo teste hiposmótico (HOST).

O teste de incubação de espermatozóides em meios hipo-osmóticos tem sido rotineiramente utilizado como uma análise laboratorial da integridade da membrana espermática no sêmen humano, uma vez que existe uma correlação positiva entre a turgidez e o enrolamento das caudas espermáticas como uma resposta às baixas pressões osmóticas e uma alta habilidade fertilizante do sêmen correspondente (Jeyedran *et al.*, 1992). Da mesma forma que na espécie humana, em bovinos (Revell e Mrode, 1994) e em suínos (Perez-Llano *et al.*, 2001) foi demonstrado existir uma correlação positiva entre a porcentagem de células espermáticas que se alteram em condições hiposmóticas e a fertilidade *in vivo* após inseminação artificial.

No espermatozóide canino, o choque hipo-osmótico induz um progressivo destacamento de acrossomas, cuja membrana é uma estrutura muito lábil que pode ser alterada por processos tais como a congelação, descongelação, resfriamento e diluição para inseminação artificial (Oettlé, 1986). England e Plummer (1993) verificaram existir uma correlação negativa entre a osmolaridade e a porcentagem de espermatozóides caninos edemaciados em soluções aquosas hiposmóticas à base de sacarose, frutose e citrato de sódio. Além disso, esses pesquisadores demonstraram não existir correlação entre a porcentagem de espermatozóides edemaciados e outros parâmetros seminais, tais como a motilidade, morfologia e porcentagem entre vivos e mortos. Em 1999, Inamassu *et al.* observaram existir no sêmen canino fresco uma correlação positiva entre a turgidez espermática em resposta ao HOST e a morfologia espermática. Entretanto, a avaliação da existência de correlação dos resultados do HOST com a capacidade fertilizante *in vitro* ou *in vivo* dos espermatozóides caninos frescos ou congelados permanece por ser verificada.

vii) Avaliação da aparência ultra-estrutural espermática: Essa análise consiste em uma avaliação morfológica profunda das estruturas que compõem a célula espermática, uma vez que segundo Hammersted *et al.* (1990), é extremamente difícil detectar os danos celulares associados à criopreservação. Assim, microanálises radiográficas possibilitam uma quantitativa localização de elementos no ambiente intracelular, através da utilização da microscopia eletrônica (Rodriguez-Martinez e Enkwall, 1989).

Burgos *et al.* (1970) realizaram um trabalho pioneiro ao avaliar, através da microscopia eletrônica, as células espermáticas de gatos, porquinhos da índia, hamsters e ratos. Em humanos, a integridade da membrana plasmática e acrossoma do espermatozóide congelado, avaliada através da microscopia eletrônica, mostrou-se positivamente correlacionadas com a fertilidade obtida após inseminação artificial (Mahadevan e Trounson, 1984).

Apesar dos avanços na microscopia eletrônica, existem poucos trabalhos apresentando uma descrição sistemática da aparência estrutural fina do espermatozóide canino (Oettlé, 1993), principalmente após os procedimentos de congelação e descongelação. Utilizando esse método, Rodriguez-Martinez *et al.* (1993) observaram que o espermatozóide descongelado apresenta um alto grau de danos acrossômicos, incluindo perda do conteúdo. Porém, eles verificaram que o plasmalema aparentemente permanecia intacto na maioria dos casos. Esses autores sugeriram que tal fato poderia ser a razão para a baixa porcentagem de anormalidades acrossômicas normalmente notificadas quando se utilizava a microscopia de contraste de fase.

viii) Testes de incubação com oócitos: A ligação do espermatozóide à zona pelúcida é um evento crítico inicial para que ocorra a interação entre os gametas que deverá culminar com a fertilização do oócito. Assim, a interação entre os gametas visualizada *in vitro* reflete a habilidade do espermatozóide em interagir com o oócito, o que indiretamente possibilita a avaliação de danos no sistema complexo de proteínas, glicoproteínas e carboidratos, sistema esse conhecido por permitir a ligação entre o espermatozóide e o oócito (Oehninger *et al.*, 1993). Desse modo, são descritas três formas de se avaliar a funcionalidade espermática: a fertilização *in vitro*, a penetração de oócitos e os testes de ligação à zona pelúcida (Mayenco-Aguirre e Perez-Cortes, 1998).

Na espécie bovina, o teste de penetração espermática em oócitos homólogos desnudos é um forte indicativo de fertilidade *in vivo*. Esse teste vem sendo utilizado com sucesso para a avaliação do sêmen congelado de touros, tornando-se um instrumento de grande utilidade para os núcleos de seleção, uma vez que reduz o tempo dos testes de fertilidade obtidos a campo (Henault e Killian, 1995; Vila *et al.*, 2001). Choldhry *et al.* (1995) sugerem que testes de penetração espermática em oócitos de hamster são eficientes para se avaliar a capacidade fecundante do sêmen ovino após o processo de criopreservação, visto haver uma forte correlação entre a fertilidade *in vitro* e *in vivo* nessa espécie. Segundo Larsson e Rodriguez-Martinez (2000), os testes de penetração e ligação à zona pelúcida e os testes de incubação do sêmen em

hemi-zona (HZT) podem ser utilizados para avaliar o efeito dos diferentes métodos de tratamento espermático, tais como o resfriamento e a congelação, sobre a habilidade fertilizante do espermatozóide canino.

Segundo Olar (1984), a avaliação da capacidade fecundante do espermatozóide canino imediatamente após a descongelação seria um parâmetro mais importante do que a simples observação da manutenção da motilidade após um período de incubação. Em um trabalho pioneiro, Froman *et al.* (1984) verificaram a capacidade fecundante *in vitro* de espermatozoides caninos frescos e congelados e observaram que o processo de congelação afeta bastante a taxa de penetração em oócitos de camundongas, sendo este talvez o motivo para as baixas taxas de fertilidade *in vivo* obtidas com o sêmen congelado.

Para a realização deste teste, Hay *et al.* (1997) relatam que podem ser utilizados oócitos caninos coletados através de ovariosalpingohisterectomias, os quais podem ser utilizados, tanto imediatamente após a cirurgia, quanto após conservação, para a avaliação do sêmen congelado de cães domésticos, lobos cinzentos (*Canis lupus*) e lobos vermelhos (*Canis rufus*). Esses autores sugerem ainda que as amostras de sêmen que retêm a motilidade após a descongelação também retêm o movimento progressivo, indicando que se elas sobreviverem a congelação serão capazes de progredir, e verificaram que baixa motilidade e aumento nos danos acrossômicos nas células espermáticas caninas após a descongelação estão correlacionadas com penetração reduzida em oócitos homólogos. Mastromonaco *et al.* (2002) demonstraram que o armazenamento de oócitos caninos em solução salina hipertônica promove danos à zona pelúcida, reduzindo as taxas de penetração espermática durante o teste de incubação. Além disso, esses autores observaram que a integridade das células do *Cumulus Ooforus* é necessária para que ocorra uma boa interação entre os oócitos e os espermatozoides caninos.

Mayenco-Aguirre e Perez-Cortez (1998) citam que na espécie canina a ligação à zona pelúcida de oócitos homólogos é significativamente afetada pela concentração espermática, sendo sugestivo o uso de concentrações superiores a 1×10^6 espermatozoides capacitados e móveis/mL. Segundo esses autores, a partir dessa concentração espermática sugerida, foi obtida uma taxa de ligação de 86%. Ivanova *et al.* (1999) observaram que diferentes cães apresentam uma variação individual quanto à possibilidade de terem seu sêmen congelado, com conseqüente variação na porcentagem de espermatozoides ligados à zona pelúcida. Strom-Holst *et al.* (2000) mostraram que a adição da pasta Equex STM ao diluente tem um efeito benéfico sobre a

capacidade de espermatozóides caninos descongelados em se ligarem à zona pelúcida de oócitos homólogos.

A fertilização *in vitro* na espécie canina não apresentou ainda um sucesso expressivo. Mahi e Yanagimachi (1976) obtiveram uma taxa de fertilização de oócitos caninos *in vitro* de 27% após 72 horas de incubação. Entretanto, esses autores não verificaram a presença de clivagem nesse experimento. Yamada *et al.* (1992) conseguiram obter embriões caninos de 8 células, 96 horas após a fertilização *in vitro*, ao utilizarem sêmen canino *in natura*. Entretanto, a taxa de clivagem obtida foi de apenas 2% do total de oócitos fertilizados. Metcalf (1999) suplementou o meio de cultivo com gonadotrofinas e observou seu efeito benéfico sobre a maturação nuclear de oócitos caninos *in vitro*. Além disso, foi obtida após 96 horas de fertilização e cultivo *in vitro* a formação de embriões caninos de 8 células, representando 2,4% do total de oócitos fertilizados *in vitro*. Otoi *et al.* (2000) obtiveram uma taxa de 13% de oócitos caninos fertilizados *in vitro*, mas apenas 0,5% do total de oócitos utilizados no experimento atingiu a fase de blastocisto inicial. Segundo esses autores, os oócitos caninos poderiam desenvolver-se ao estágio de blastocisto após maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, embora a competência do oócito em desenvolver-se esteja significativamente reduzida após esses procedimentos. Recentemente, Rodrigues (2004) avaliaram o efeito do estágio reprodutivo das cadelas doadoras de oócitos sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*, e observaram que esse desenvolvimento estaria mais dependente de condições intrínsecas dos oócitos, do que propriamente do estágio reprodutivo das cadelas.

O teste de penetração oocitária consome menos tempo do que a fertilização *in vitro* visto que não há a necessidade de maturar o oócito e somente a penetração é avaliada e não o seu desenvolvimento (Hewitt e England, 1997). A penetração do espermatozóide na zona e/ou ooplasma mostrou-se intimamente associada à motilidade espermática (Hay *et al.*, 1997), mas não apresentou correlações com a integridade do acrossoma (Rodrigues *et al.*, 2004). De um modo geral, são escassas as informações a respeito das relações entre os resultados do teste de penetração e os diferentes parâmetros avaliados no sêmen canino após descongelação.

ix) Teste de fertilidade *in vivo*: Uma vez que muitos dos parâmetros avaliados *in vitro* não são correlacionados com a fertilidade, a inseminação artificial de um grande número de fêmeas é ainda o teste mais confiável ao se comparar os métodos de preservação de sêmen (Amann e Hammerstedt, 1993). Em cães, testes de fertilidade são difíceis de serem realizados

devido ao número limitado de cadelas disponíveis e a longa duração do seu ciclo estral (Souza, 2003), bem como devido à baixa eficiência dos protocolos de indução e sincronização de estro reportados para uso nessa espécie (Eilts, 2005). Além disso, deve-se ter em mente que os resultados de fertilidade *in vivo* são dependentes não apenas da qualidade seminal, mas também de fatores inerentes à fertilidade da fêmea (Eilts, 2005).

Devido existirem diversos fatores ligados ao sucesso da inseminação artificial, os dados referentes a esse tópico originaram um artigo publicado na Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, o qual se encontra a seguir.

ARTIGO DE REVISÃO

**Principais aspectos ligados à aplicação da
inseminação artificial na espécie canina**

Main aspects for the accomplishment of artificial insemination in canine species

**Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias
98 (546): 53-60, 2003**

Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina

Main aspects for the accomplishment of artificial insemination in canine species

Alexandre R. Silva, Rita de Cássia S. Cardoso, Lúcia D. M. Silva

Laboratório de Reprodução de Carnívoros / PPGCV / UECE. Av. Paranjana, 1700, Itaperi, 60740-000, Fortaleza - Ceará, Brasil

Resumo: A inseminação artificial pode ser utilizada como um meio alternativo na impossibilidade de realização de monta natural ou na utilização de sémen refrigerado ou congelado. Assim, o presente trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão geral acerca dos principais aspectos ligados à aplicação dessa biotécnica na espécie canina. Dentre esses aspectos, pode-se destacar a utilização de sémen fresco, refrigerado e congelado; os diversos métodos descritos para o monitoramento do ciclo estrico, como a citologia vaginal, vaginoscopia, dosagens hormonais, ultrassonografia e mensuração de resistência elétrica do muco cervical; bem como as vias de inseminação intravaginal e intrauterina. Finalmente, são traçadas considerações sobre a eficiência da inseminação artificial nessa espécie de fisiologia tão particular.

Summary: The artificial insemination can be used as an alternative way when the natural mating cannot be performed or when chilled or frozen semen is used. Thus, the aim of this study is to present a general review about the main aspects for the accomplishment of this biotechnique in canine species. Concerning those aspects, it can stand out the use of fresh, chilled and frozen semen; the several methods described for the estral cycle monitoring, as the vaginal cytology, vaginoscopy, hormone assay, ultrasound and electric resistance measurement of the cervical mucus; as well as the routes of insemination intravaginal and intrauterine. Finally, considerations are made on the efficiency of the artificial insemination in that species of such a peculiar physiology.

Introdução

A inseminação artificial (IA) consiste em, após a obtenção do sémen, depositá-lo no trato genital da fêmea a ser inseminada. Essa técnica pode ser utilizada como um meio alternativo quando da impossibilidade de realização de monta natural, devido a problemas anatômicos, comportamentais e sanitários, ou ainda, quando da utilização de sémen refrigerado ou congelado. Sendo de principal relevância este último, que possibilita a manutenção da capacidade fecundante em animais de alto interesse zootécnico por um espaço indeterminado de tempo, além de resguardar tais animais do estresse causado pelo seu transporte para fins de acasalamento (Guérin, 1998).

A primeira IA notificada cientificamente foi realizada no final do século XVIII por Spallazani, que utilizou sémen fresco obtido da vagina de uma cadela naturalmente acasalada e depositou-o na vagina de uma outra cadela utilizando uma seringa. Esse procedimento resultou no nascimento de três filhotes após 62 dias (Johnston *et al.*, 2001).

Somente em 1954 foi descrita por Harrop a primeira IA com sémen canino refrigerado a 4°C. Após 15 anos, Seager (1969) obteve a primeira gestação utilizando sémen canino congelado, resultando no nascimento de dois filhotes. Nos anos 80, estabeleceu-se a utilização do sémen canino fresco ou refrigerado e os resultados têm se aproximado aos obtidos por monta natural. Porém, os resultados obtidos através da IA com sémen canino congelado são ainda bastante heterogêneos (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Silva, 1995). Nesse sentido, o presente estudo apresenta uma revisão geral acerca dos principais aspectos ligados à aplicação da IA na espécie canina.

Coleta e análise seminal

De um modo geral, utiliza-se para a inseminação artificial um macho de escolha do proprietário da cadela a ser inseminada. Entretanto, com o surgimento dos bancos de sémen canino, preconiza-se a realização de uma seleção dos animais doadores. Assim, observa-se que esta seleção pode exercer um marcado efeito sobre a fertilidade, tal qual é descrito para outras espécies, visto que existe uma grande variação individual entre os cães (England, 1993). Por essa razão, a seleção de reprodutores deve ser feita através de uma detalhada anamnese, verificando-se o desempenho reprodutivo anterior do macho e problemas de saúde atuais ou prévios. Deve também ser procedido um cuidadoso exame clínico geral e andrológico, que deve incluir a inspeção e palpação dos órgãos reprodutivos, observando-se principalmente o tamanho e a consistência testicular, visto que cães com espermatogênese anormal frequentemente têm testículos de consistência inferior à normal. Em seguida, deve-se proceder à coleta e avaliação do sémen e inspeção do comportamento de monta (libido), podendo ter continuidade com testes hormonais e análises cromossômicas (Christiansen, 1988, Feldman e Nelson, 1996).

O ejaculado canino é naturalmente dividido em três frações distintas (Harrop, 1955). A primeira fração consiste em um fluido claro originado na próstata e

supõe-se ser responsável pela limpeza do canal uretral (England e Allen, 1992). A segunda fração, rica em espermatozoides, é de origem testicular e apresenta volume variável conforme o tamanho testicular e a variação individual, possuindo aspecto turvo, leitoso e opalescente (Christiansen, 1988). A terceira fração é o fluido prostático que deve ser claro e facilmente distinguível da fração espermática. Apresenta um grande volume e serve como um meio diluidor natural proporcionando o transporte dos espermatozoides no trato genital da cadela (England e Allen, 1992).

O sémen é facilmente colhido de cães, em especial daqueles com experiência prévia de acasalamento. A presença de uma cadela em estro pode melhorar a qualidade do ejaculado, particularmente no caso de cães inexperientes ou tímidos. Pode-se ainda congelar zaragatoas impregnadas de secreções vaginais de cadelas em estro (Silva, 2001) ou impregnadas com o feromônio sintético metil-?-benzoato (Goodwing *et al.*, 1979), que podem ser passados na região perianal de uma cadela no momento da coleta do sémen. Assim, o cão irá reagir como se estivesse diante de uma cadela em cio.

Diversos métodos foram descritos para a coleta de sémen nesta espécie, tais como: massagem digital, uso de vagina artificial, vibrador elétrico e eletroejaculação (Harrop, 1955; Christiansen, 1988). Segundo Boucher *et al.* (1958), a massagem digital permite a obtenção de um sémen de qualidade superior ao obtido por vagina artificial, sendo que o primeiro método é especialmente confiável mesmo para cães não condicionados. Althouse *et al.* (1991) observaram que a exposição do sémen fresco às luvas de látex e/ou vinil causa um imediato decréscimo na motilidade espermática, devendo-se evitar tal contato durante a massagem digital, que é hoje o método de eleição para a coleta do sémen nesta espécie.

A massagem digital consiste em massagear o prepúcio do cão na altura do bulbo cavernoso peniano, até que o animal atinja a ereção parcial. O prepúcio é então retraído para trás do bulbo e o pênis é apertado com moderada pressão, posteriormente ao bulbo (Seager e Fletcher, 1972; Christiansen, 1988). O ejaculado é coletado fracionadamente com o auxílio de um funil de vidro ou plástico que desemboca em tubos graduados (Gill *et al.*, 1970), devendo-se evitar o contato direto entre o pênis e o material de coleta (Seager e Fletcher, 1972).

A análise padrão da fração espermática do ejaculado é rotineiramente utilizada para avaliar a qualidade do sémen canino, incluindo a observação do volume, coloração, viscosidade, pH e osmolaridade. A avaliação microscópica do sémen inclui a observação da concentração e morfologia espermática, bem como a avaliação subjetiva da porcentagem de espermatozoides móveis na amostra (motilidade) e a qualidade dessa motilidade, denominada de vigor (Christiansen, 1988; Feldman e Nelson, 1996; Johnston *et al.*, 2001). Vale salientar que diversos métodos de análise seminal computadorizada (CASA) já foram validados para a espécie canina, entre eles destacam-se o Analisador de Qualidade Espermática (SQA) e o Hamilton Thorn (HTR), os quais permitem uma avaliação objetiva e

precisa dos parâmetros microscópicos seminais (Iguer-Ouada, 2001).

Embora a relação entre a motilidade e a capacidade fecundante do espermatozoide canino não esteja totalmente elucidada, a maioria dos pesquisadores ainda utiliza a motilidade como o principal parâmetro para a avaliação do sémen canino (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997). Assim, uma amostra normal de sémen deve exibir uma motilidade mínima de 70% (Christiansen, 1988). Em seguida, deve-se avaliar o vigor espermático, que é a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozoides móveis, observada em escala que varia de 0 a 5 (Platz e Seager, 1977). Em 1993, Oettlé demonstrou que a morfologia espermática normal em cães estaria melhor correlacionada com a fertilidade após IA, do que a simples observação da motilidade espermática, sendo que haveria um decréscimo nessa fertilidade caso fossem utilizadas amostras de sémen apresentando morfologia espermática normal inferior a 60%.

Diversos outros métodos foram descritos para a avaliação da qualidade seminal. Dentre estes, podem ser destacados o teste de termorresistência (Ström *et al.*, 1997), o teste hipo-osmótico (England e Plummer, 1993), o teste de capacitação e reação acrossômica *in vitro* (Hewitt e England, 1998), a análise ultra-estrutural (Rodrigues-Martinez *et al.*, 1993) e os testes de incubação comócitos homólogos ou heterólogos (Mayenco-Aguirre e Perez-Cortéz, 1998; Metcalf, 1999; Larsson e Rodrigues-Martinez, 2000; Mastromonaco *et al.*, 2002).

Processamento de sémen

A IA com sémen fresco oferece taxas de gestação similares às obtidas com a monta natural (Pereira *et al.*, 2001). Entretanto, o sémen fresco apresenta pouca flexibilidade, devendo ser utilizado em um curto período após sua coleta. Segundo England (1999), caso o volume ou a concentração espermática não seja suficiente para a IA, deve-se realizar uma nova coleta para incrementar a amostra. Por ocasião da IA, é necessário realizar a expansão da fração espermática, a qual é geralmente realizada adicionando-se o líquido prostático autólogo até ser atingido o volume mínimo desejado (Nothling e Volkmann, 1993; Uchoa *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002a). Entretanto, pode-se também fazer uso de diluidores, como o Tris (Uchoa *et al.*, 2001), água de coco (Pereira *et al.*, 2001), solução salina fisiológica (Silva *et al.*, 2002a) e o leite desnatado (Betini *et al.*, 2001).

Quando não é necessário o emprego imediato do sémen, sua viabilidade é prolongada através da refrigeração e da adição de diluidores, como o leite desnatado e a glicina-gema (Cunha e Lopes, 1997), o Tris-gema (Stornelli *et al.*, 2001) e a água de coco (Fontenele *et al.*, 2002). O sémen refrigerado apresenta maior flexibilidade que o fresco, podendo ser transportado em garrafas térmicas e manter-se viável por um a cinco dias, desde que a temperatura seja mantida em torno de 4 e 5 °C (Province *et al.*, 1984; England e Ponzio, 1996). Recentemente, Iguer-Ouada (2001) obteve êxito ao prolongar a viabilidade do sémen canino por mais de 20 dias, através troca do meio diluidor Tris,

conferindo uma renovação de substrato energético para as células espermáticas.

O sémen canino pode ser ainda congelado e armazenado por tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante quando reaquecido e utilizado em IA. Desse modo, o sémen congelado é o que oferece maior flexibilidade de uso, porém é o que sofre as mudanças mais drásticas quanto à sua qualidade pós-descongelamento (Concannon e Battista, 1989). Diversos diluidores são utilizados para a congelamento do sémen canino, dentre eles podemos destacar a lactose (Seager, 1969), o Tris (Andersen, 1975), o Triladyl (Nothling *et al.*, 1995), o Biociphos W482 e o Laiciphos 478 (Silva, 1995), o diluidor comercializado pelo Cryogenetics Laboratory of New England - CLONE (Ström *et al.*, 1997) e, mais recentemente, um diluidor à base de água de coco (Cardoso *et al.*, 2003). Entretanto, em diversas publicações, o tampão Tris tem-se mostrado superior a outros diluidores, tanto para a refrigeração, quanto para a congelamento, sendo este o diluidor mais utilizado pela maioria dos grupos de pesquisa da atualidade (Farstad, 1996; Silva *et al.*, 2000).

A gema de ovo de galinha é adicionada ao Tris, geralmente na proporção de 20% (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Silva *et al.*, 2003), por promover a proteção da célula espermática contra o choque térmico (Watson e Plummer, 1985; Hammerstedt *et al.*, 1990). Dentre os agentes crioprotetores que podem ser utilizados destacam-se o glicerol (Polge *et al.*, 1949), o dimetilsulfóxido (Olar *et al.*, 1989), o metanol (Kim *et al.*, 1994) e o etileno-glicol (Santos *et al.*, 2001). Entretanto, o glicerol (CH₃H₈O₃) é o crioprotetor mais empregado na congelamento de sémen canino em concentrações variando entre 2 e 8%, dependendo da composição do diluidor utilizado (Ravaszova *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2003). Finalmente, pode-se ainda adicionar ao diluidor a pasta Equex, que é um aditivo comercial para sémen, contendo o dodecil-sulfato, o qual possibilita um aumento na resistência aos danos oriundos da congelamento (Rota *et al.*, 1999).

Diversas metodologias têm sido descritas para a congelamento do sémen canino e variam de acordo com o diluidor e agentes crioprotetores empregados, preconizando o uso de diferentes velocidades de congelamento. Em todas elas, busca-se minimizar o dano causado ao espermatozóide pelo processamento, visando recuperar um máximo possível de espermatozóides viáveis (Ström *et al.*, 1997). Dentre os diversos métodos existentes, o mais usual é o descrito por Andersen (1975), que serve como base para inúmeros estudos onde têm sido realizadas pequenas modificações nesse método, alcançando excelentes resultados *in vitro* (Ström *et al.*, 1997) e *in vivo* (Rota *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 2000). Existem também vários protocolos preconizando diferentes temperaturas e velocidades de descongelamento para o sémen canino. Usualmente, este processo é realizado sob imersão em banho-maria a temperaturas que variam de 37 °C (Linde-Forsberg, 1991) a 75 °C (Olar *et al.*, 1989). Ademais, a armazenagem do sémen canino pode ser realizada em pastilhas (Battista *et al.*, 1988), tubos de alumínio de 5 mL (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997) ou, preferencialmente, em palhetas (Cardoso *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003).

Monitoramento do ciclo éstrico da cadela

A problemática da obtenção de sucesso através da IA na espécie canina está diretamente ligada às dificuldades concernentes à determinação do momento ideal para inseminação nessa espécie de fisiologia reprodutiva particular. Segundo Concannon *et al.* (1977), a ovulação ocorreria de maneira sincrônica entre 36 e 50 horas após o pique de hormônio luteinizante (LH). Os ovócitos emitidos não estariam ainda maduros, encontrando-se no estado de vesícula germinativa. A maturação seria então concluída dois a três dias mais tarde com a emissão do segundo corpúsculo polar (Holst e Phemister, 1971; Tsutsui, 1989). A partir desse momento, o ovócito seria fecundável, mas a sua sobrevivência parece ser muito curta, de apenas 24 a 48 horas (Concannon e Battista, 1989). O limite máximo de fecundação se encontraria em torno de 6,5 dias depois do pique de LH (Tsutsui, 1989), sendo o período ideal de fecundação entre três e quatro dias depois do pique. No entanto, esses estudos não nos permitem determinar precisamente o momento e o caráter sincrônico da ovulação (Silva, 1995). Devido a essa problemática, segue-se uma abordagem dos diversos métodos descritos para o monitoramento do ciclo éstrico da cadela, visando a determinação do momento ideal para a realização da IA.

Inicialmente, sugere-se a observação das mudanças anatômicas e comportamentais da cadela que ocorrem principalmente durante o proestro, que dura em torno de 9 dias, caracterizando-se por edemaciação vulvar, associada a uma descarga serosanguinolenta vaginal, em resposta às altas concentrações de estrógeno. Usualmente, nesse momento, a cadela atrai os machos, mas não permite ser acasalada, mantendo a cauda sobre a vulva e demonstrando um comportamento agressivo (Johnston *et al.*, 2001). A fase subsequente é denominada de estro e caracteriza-se pela vulva aumentada e amolecida, diminuição das descargas vaginais e aceitação do acasalamento pelo macho (Allen, 1992), com exibição da vulva através do afastamento da cauda (Uchoa *et al.*, 2001). No início dessa fase, o estrógeno atinge seu pique máximo, a partir do qual inicia seu declínio. Esse pique de estrógeno promove o pique de LH, que por sua vez é responsável pelo desencadear da ovulação, que irá culminar na elevação dos níveis de progesterona (Concannon *et al.*, 1989).

Outro método prático sugerido para o acompanhamento do ciclo éstrico da cadela é a associação da observação de suas mudanças comportamentais e anatômicas com a citologia vaginal. Porém, como este método não é muito preciso, ele fica reservado à inseminação artificial com o sémen fresco. Assim, tal método se baseia na observação do perfil citológico da cadela, o qual sofrerá mudanças bem características de acordo com as fases do ciclo éstrico (Schutte, 1967). A inseminação deve ser realizada quando a fêmea estiver receptiva ao macho e apresentar uma citologia com pelo menos 70% de células epiteliais superficiais. No entanto, uma grande parcela de cadelas candidatas a IA com sémen fresco são justamente aquelas que têm desvio de comportamento, não

aceitando a cópula e não manifestando comportamento sexual normal. Nesses casos, o comportamento não pode ser utilizado como guia, ficando a citologia vaginal como método isolado. Essa última é excelente para guiar o veterinário dentro do ciclo éstrico da cadela, mas nem sempre é eficaz quando utilizada isoladamente (Silva *et al.*, 2002b). Segundo England e Allen (1989), além da morfologia celular observada através da citologia vaginal convencional, o padrão de cristalização do muco vaginal das cadelas em estro deve também ser observado, uma vez que o mesmo apresentaria alterações de acordo com o aparecimento do pique estrogênico no decorrer do ciclo éstrico.

Uma alternativa para aumentar a eficiência na determinação do momento ótimo para IA é o acompanhamento da cadela por vaginoscopia (Lindsay, 1983). Baseando-se nesse método, o momento ideal para a realização da IA seria quando a mucosa vaginal apresentar pregas fortemente angulosas e de coloração pálida (Johnston *et al.*, 2001). Tanto os endoscópios fibro-ópticos, quanto proctoscópios pediátricos, com diâmetro inferior a 12 mm, podem ser utilizados na maioria das cadelas a fim de se visualizar as mudanças na região cranial da vagina. O uso de ambos os instrumentos requer prática e atenção, no intuito de não causar danos à estrutura anatômica da cadela (Burke, 1996).

O método mais eficiente para se determinar o momento ótimo para a IA é através da dosagem de progesterona plasmática, uma vez que a cadela é a única dentre as fêmeas domésticas que apresenta uma evolução da progesteronemia dois a três dias antes da ovulação (Johnston *et al.*, 2001). Os valores de progesterona sérica são inferiores a 1,0 ng/mL durante o anestro e a maior parte do proestro e rapidamente começam a aumentar nas proximidades do pique de LH (Concannon *et al.*, 1989). A dosagem da progesteronemia é hoje uma prática rotineira que pode ser feita com auxílio de kits semiquantitativos comerciais do *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou por laboratórios especializados que fornecem valores quantitativos obtidos por radioimunoensaio (RIA). O RIA é geralmente o mais acurado das duas técnicas, sendo, entretanto, mais caro e requerendo maior tempo de execução (Johnston *et al.*, 2001). Segundo Johnston *et al.* (2001), o momento ideal para a realização da IA seria dois dias após a progesterona ter atingido concentrações entre 4 e 10 ng/mL. Dosagens paralelas de progesterona e hormônio luteinizante (LH) mostraram que o início da elevação significativa da progesteronemia corresponde ao pique do LH, o qual pode ser uma referência importante para definir-se as datas da inseminação, uma vez que a ovulação costuma ocorrer 48 horas após o pique desse hormônio (GUÉRIN, 1998). Atualmente, testes de RIA e ELISA encontram-se comercialmente disponíveis para a dosagem do LH sérico. No entanto, a mensuração desse hormônio apresenta o inconveniente da necessidade de diversas coletas sanguíneas diárias (Johnston *et al.*, 2001).

Hase *et al.* (2000) investigaram o uso da ultrasonografia como método para prever a ovulação na cadela. Entretanto, a ocorrência da ovulação só foi observada em 54,5% das cadelas estudadas. Por outro

lado, Silva *et al.* (1996) já haviam verificado a dificuldade de se determinar a ovulação na cadela por ultra-sonografia, em virtude da presença de uma bolsa de tecido conjuntivo circundando o ovário.

Mudanças na resistência elétrica dos fluidos vaginais têm sido utilizadas com sucesso na determinação do momento ideal para a inseminação em Raposas Azuis e Prateadas (Fougner, 1989). Esse método foi também descrito para a espécie canina, tendo sido constatado sucesso, desde que o detector de resistência elétrica seja sempre colocado na mesma posição da vagina da cadela. No entanto, a extensa variação no tamanho da vagina das cadelas nas diversas raças dificulta o procedimento nessa espécie (Johnston *et al.*, 2001).

Vias de inseminação artificial

A IA intravaginal (IAIV) consiste na deposição do sêmen na vagina da cadela e apresenta-se como a via de escolha na maioria dos casos, por ser de fácil execução e por oferecer bons resultados de um modo geral. Para a IAIV pode-se utilizar uma pipeta rígida de vidro ou plástica, geralmente utilizada para a inseminação de bovinos (Seager e Fletcher, 1972; Seager e Platz, 1977); um pênis artificial, que consiste em um dispositivo plástico preenchido por ar, imitando as dimensões do pênis do cão (Kojima *et al.*, 1996ab) ou a sonda de Osíris (Mialot *et al.*, 1985).

A sonda de Osíris é uma pipeta plástica flexível munida de um pequeno balão inflável na sua extremidade distal, imitando o enchimento dos bulbos eréteis do pênis do cão durante o coito e impedindo o refluxo do sêmen. O balonete evita também o recuo da sonda e estimula o peristaltismo vaginal, tal qual ocorre no coito. Essa sonda realiza a aspensão do sêmen diretamente na porção cranial da vagina (Mialot *et al.*, 1985).

No protocolo clássico de IAIV, recomenda-se a elevação do trem posterior da cadela por 5 a 20 minutos, visando-se evitar o refluxo do sêmen (Seager, 1986). Porém, Pinto *et al.* (1998) observaram que a redução no tempo de elevação do trem posterior de 10 para 1 minuto não compromete a fertilidade, nem a prolificidade das cadelas. Além disso, Tsutsui *et al.* (1989) citam que os espermatozoides caninos conseguem atingir o corno uterino um a dois minutos após a deposição vaginal do sêmen.

A IA por via intrauterina (IAIU), que consiste na deposição do sêmen diretamente dentro do útero, fica reservada para casos particulares, onde a via vaginal poderia comprometer os resultados da IA, como, por exemplo, na utilização de um sêmen congelado com baixa qualidade pós-descongelamento (Silva, 1995). Segundo Johnston *et al.* (2001), a IAIU pode ainda ser utilizada como uma alternativa para melhorar as taxas de fertilidade de machos oligospermicos, ou seja, com um baixo número de espermatozoides no ejaculado.

Várias abordagens têm sido realizadas com o intuito de se desenvolver técnicas para a IAIU, na qual a deposição do sêmen é realizada diretamente dentro do útero da fêmea por via transcervical ou através de procedimentos cirúrgicos transabdominais como a laparotomia e laparoscopia.

A IAIU via transcervical não é uma técnica fácil de ser executada e, em alguns casos, a tranquilização do animal pode ser necessária. O cateterismo cervical foi adaptado para a espécie canina a partir de experimentos prévios realizados na raposa azul (Fougner *et al.*, 1973). Na cadela, esta técnica exige destreza do operador devido à anatomia particular do cérvix e à presença da prega médio-dorsal da vagina (Pineda *et al.*, 1973; Linde, 1978; Lindsay, 1983). Assim, para sua execução são utilizados uma bainha plástica e o catéter escandinavo, o qual é transpassado através do cérvix, sendo este palpado por via abdominal, permitindo a deposição do sémen diretamente no corpo uterino. O catéter escandinavo consiste em um catéter metálico com 0,75 a 1,0 mm de diâmetro, sendo comercializado em três diferentes tamanhos: 20, 30 ou 40 cm (Andersen, 1975).

A IAIU por laparotomia foi desenvolvida no intuito de transpor as dificuldades do cateterismo cervical. No entanto, essa técnica comporta uma intervenção cirúrgica com todos os riscos implícitos. Além disso, uma anestesia profunda poderia interferir na motilidade uterina e na migração oocitária (Tsutsui *et al.*, 1989).

A IAIU por laparoscopia, apesar considerada uma técnica semicirúrgica, tem caráter pouco invasivo e é de rápida execução, uma vez que o sémen pode ser depositado em apenas um corno uterino, haja vista que os espermatozoides rapidamente migram para o outro corno (Tsutsui *et al.*, 1989). Os resultados obtidos após IAIU por laparoscopia, tanto com sémen fresco, como com sémen congelado, têm sido satisfatórios (Silva, 1995).

Em alguns países europeus, a realização de inseminações por métodos cirúrgicos, existindo a possibilidade do procedimento não-cirúrgico, é considerada antiética (Farstad, 2000). Assim, a endoscopia vaginal parece ser o método do futuro para a sondagem do colo uterino, uma vez que ela possui a grande vantagem de possibilitar a visualização da abertura do cérvix sem a necessidade de sedação do animal (Wilson, 1993; Shin *et al.*, 1997). Segundo Wilson (1993), esse método proporcionaria taxas de concepção em torno de 80%, mesmo com a utilização do sémen congelado. Para sua execução, é utilizado um endoscópio fibro-óptico rígido conectado a uma fonte luminosa e um cateter urinário, sendo necessária a palpação abdominal para auxiliar a guiar tais instrumentos.

Eficiência da inseminação artificial

A IA com sémen canino fresco, contendo um número adequado de espermatozoides, proporciona resultados de fertilidade similares àqueles obtidos pela monta natural (Pereira *et al.*, 2001; Uchoa *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002a), a qual, segundo Daurio *et al.* (1987), apresenta eficiência em torno de 85% nesta espécie.

No uso do sémen refrigerado, Pinto *et al.* (1999) obtiveram 90% e 100% de fertilidade em cadelas submetidas a IAIV com sémen refrigerado por 24 e 48 horas, respectivamente. Mas, segundo Guérin (1998), os resultados são geralmente inferiores àqueles obtidos com o sémen fresco, sendo obtida uma taxa de fertilidade em torno de 70%. Além disso, o sucesso

desse método estaria dependente de uma boa coordenação entre o envio do sémen e o momento de realização da inseminação.

As taxas de concepção observadas após IA com sémen congelado são sensivelmente inferiores às obtidas com sémen fresco (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989). Esse fato é provavelmente devido à viabilidade e fecundidade reduzida dos espermatozoides congelados. Isso pode ser devido ao processo de congelamento e descongelamento, à qualidade do sémen após congelamento, aos tipos de meios utilizados, dentre outros fatores. De fato, segundo Concannon e Battista (1989) e Fontbonne e Badinand (1993b), a viabilidade do espermatozoide após descongelamento pode variar de 12 a 24 horas.

Ademais, no uso de sémen congelado, as taxas de concepção são geralmente mais altas quando o sémen é depositado no útero, comparado à deposição vaginal (Olar *et al.*, 1989; Concannon e Battista, 1989). Entretanto, Silva (1995) descreve 100% de gestação para a IAIU por laparotomia e a IAIV utilizando-se a sonda de Osíris com o sémen congelado, o que implica que a própria metodologia de inseminação pode influenciar os resultados. Resultados semelhantes foram também descritos por Fontbonne e Badinand (1993a), os quais encontraram taxa de fertilidade de 52,6% a partir de IAIV com a sonda de Osíris, e 73,6% em IAIU transcervical por cateterismo, não sendo evidenciadas diferenças estatísticas entre os dois métodos.

Com relação ao número de IA, Uchoa *et al.* (2001) e Silva *et al.* (2002a) sugerem a realização de duas inseminações, geralmente, com intervalos de 48 horas, utilizando o sémen a fresco. Esse mesmo número de inseminações é sugerido por Silva (1995) para a utilização de sémen congelado. Ademais, no uso de sémen refrigerado por até 11 dias, Iguer-Ouada (2001) obteve 50% de fertilidade após a realização de uma única IA.

O número mínimo de espermatozoides requerido para a IA não está bem estabelecido. Taxas de fertilidade satisfatórias já foram obtidas com doses inseminantes de 35×10^6 espermatozoides móveis após IAIU e de 50×10^6 espermatozoides móveis após IAIV (Wilson, 1993). De um modo geral, a IAIU requer uma menor concentração de espermatozoides por IA do que a técnica de IAIV.

Segundo Guérin (1998), a fertilidade entre as raças é bastante variável, sendo ainda constatado que o número de espermatozoides por ejaculado varia proporcionalmente de acordo com o tamanho do cão. Assim, talvez seja necessário aumentar a dose inseminante para as raças de grande porte, uma vez que esse maior número de espermatozoides poderia estar correlacionado a um maior comprimento do aparelho genital da cadela.

Considerações finais

Apesar da difundida utilização da IA na espécie canina na atualidade, são necessários ainda um maior conhecimento e controle dos fatores que podem influenciar seu sucesso. Assim, diversos estudos continuam a ser conduzidos visando encontrar metodologias de preservação de gametas que permitam uma perda mínima da qualidade seminal, uma maior

eficácia na determinação do momento ideal para a inseminação e utilização de uma via eficiente que não traga riscos ao animal.

Entende-se, desse modo, que a IA em cães seria apenas o começo de uma nova era para a reprodução e otimização do material genético de canídeos domésticos e selvagens, uma vez que as biotecnologias estabelecidas para a espécie canina poderiam servir como base para estudos visando a preservação e difusão do material genético oriundo de canídeos selvagens ameaçados ou em extinção, haja vista a similaridade filogenética entre tais espécies (Wayne e Vila, 2001).

Bibliografia

- Allen, W.E. (1992) Fertility and Obstetrics in the Dog. Blackwell Scientific Publications (Oxford).
- Althouse, G.C., Ko, J.C.H., Hopkins, S.M., Evans, L.E. (1991) Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 199, 227-229.
- Andersen, K. (1975). Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*, 10, 1-4.
- Battista, M., Parks, J., Concannon, P. (1988). Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using pipes, lactose, tris or test extenders. *Proceedings 11^o International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 3, 229.
- Betini, C.M., Moraes, G.V., Rigolon, L.P. (2001). Inseminação artificial de cadelas com sêmen fresco diluído em meios formulados com água de coco e leite em pó desnatado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25 (3), 373-375.
- Boucher, J., Foote, R.H., Kirk, R.W. (1958). The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. *Cornell Veterinary*, 48, 67-86.
- Burke, T.J. (1986). Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment, Ed. Lea & Febiger (Philadelphia).
- Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59, 743 – 751.
- Christiansen, I.J. (1988). Reprodução no cão e no gato. Editora Manole (São Paulo).
- Concannon, P.W., Hansel, W., McEntee, K. (1977). Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biology of Reproduction*, 17, 604-613.
- Concannon, P.W., McCann, J.P., Temple, M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 39, 3-25.
- Concannon, P.W., Batista, M. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy*, 10, 1247-1259.
- Cunha, I.C.N., Lopes, M.D. (1997). Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluidores à base de leite e glicina gema. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 21 (2), 1997.
- Daurio, C.P., Gilman, M.R., Pulliam, J.D., Seward, R.L. (1987). Evaluation of male Beagles and safety of ivermectin. *American Journal of Veterinary Research*, 48, 1755-1760.
- England, G.C.W. (1993). Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 243 -255.
- England, G. C. W., Ponzio, P. (1996). Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, 46, 165-171.
- England, G.C.W., Allen, W.E. (1989). Crystallization patterns in anterior vaginal fluid from bitches in oestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 86, 335-339.
- England, G.C.W., Allen, W.E. (1992). Factors affecting the viability of canine spermatozoa II: Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, 37, 373 – 381.
- England, G.C.W., Plummer, J.M. (1993). Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 261 – 270.
- England, G.C.W. (1999). Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*, 52, 981-986.
- Farstad, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, 42, 251-260.
- Farstad, W. (2000). Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53, 175-186.
- Feldman, E.C., Nelson, R.W. (1996). Canine and feline endocrinology and reproduction. W. B. Saunders Company (Philadelphia).
- Fontbonne, A., Badinand, F. (1993a). Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 325-327.
- Fontbonne, A., Badinand, F. (1993b). Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 531-532.
- Fontenelle, P.S., Cardoso, J.F.S., Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2002). Conservação a 5 °C do sêmen canino diluído em água de coco. *Ciência Animal*, 12, 153-156.
- Fougner, J.A., Aamdal, J., Andersen, K. (1973). Intrauterine insemination with frozen semen in the blue fox. *Nordic Veterinary Medicine*, 25, 144-149.
- Fougner, J.A. (1989). Artificial insemination in fox breeding. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 39, 317-323.
- Gill, H.P., Kanfran, C.F., Foote, R.F., Kirk, R.W. (1970). Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. *American Journal of Veterinary Research*, 31, 1807-1813.
- Goodwin, M., Gooding, K.M., Regnier, F. (1979). Sex pheromone in the dog. *Science*, 203: 559-561.
- Guérin, C. (1998). A inseminação artificial na espécie canina. *A Hora Veterinária*, 105, 25-32.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11, 73-88.
- Harrop, A.E. (1954). Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Veterinary Record*, 110, 194-196.
- Harrop, A.E. (1955). Some observations on canine semen. *Veterinary Record*, 67, 494-498.
- Hase, M.; Hori, T., Kawakami, E., Tsutsui, T. (2000). Plasma LH and progesterone levels before and after

- ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis systems in dogs. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 62 (3), 243-248.
- Hewitt, D.A., England, G.C.W. (1998). An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Animal Reproduction Science*, 51, 321-332.
- Holst, P. A., Phemister, R. D. (1971). The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biology of Reproduction*, 5, 194 – 206.
- Iguer-Ouada, M. (2001) *Medically assisted procreation in Canine Species: Analyses and 4 °C preservation of semen*. Tese (Doutorado) Université de Liège, Liège, 219p..
- Ivanova-Kicheva, M.G., Bobadov, N.D., Somlev, B. (1997). Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology*, 48, 1343-1349.
- Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R., Olson, P.N.S. (2001). *Canine and feline theriogenology*. W.B.Saunders (Philadelphia).
- Kim, Y.J., Park, Y.J., Kim, B.J., Yu, I.J. (1994). Artificial insemination with frozen semen in the dog – simple freezing method using methanol. *Korean Journal of Veterinary Research*, 34(4), 851-855.
- Kojima, Y., Kawakami, W., Shino, M., Ohchi, T. (1996a). A small trial on a new insemination technique with fresh dog semen using the artificial penis. *Journal of Reproduction and Development*, 42 (5), 39-41.
- Kojima, Y., Kawakami, W., Shino, M., Ohchi, T. (1996b). Preliminary test of artificial insemination in the dog – intrauterine transportation of liquid using the artificial penis, *Journal of Reproduction and Development*, 42 (5), 35-38.
- Larsson, B., Rodríguez-Martínez, H. (2000). Can we use in vitro fertilization to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science*, 60-61, 327-336.
- Linde, C. (1978). Transport of radiopaque fluid into the uterus after vaginal deposition in the oestrous bitch. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 19, 463-465.
- Linde – Forsberg, C., Forsberg, M. (1989). Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 39, 299-310.
- Linde-Forsberg, C. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21 (3), 467-485.
- Lindsay, F.E.F. (1983). The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy, *Journal of Small Animal Practice*, 24, 1-15.
- Mastromonaco, G.F., Hay, M.A., Goodrowe, K.L. (2002). The effect of oocyte storage and Cumulus cell presence on canine zone penetration by domestic dog spermatozoa. *Theriogenology*, 57, 1123-1134.
- Mayenco-Aguirre, A.M., Pérez-Cortés, A.B. (1998). Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology*, 50 (2), 195-204.
- Metcalf, S. (1999). Assisted reproduction in the bitch. Thesis (Master of Sciences). Institute of Reproduction and Development – Faculty of Science, Monash University, Australia, 161p.
- Mialot, J.P., Dumon, C., Cassou, B. (1985). Insémination artificielle chez la chienne: Mise en place de sémence fraîche avec le pistolet souple "Osiris", *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 20 (3), 213-220.
- Nöthling, J.O., Volkmann, D.H. (1993). Effects of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 335-341.
- Nothling, J.O., Gerstenberg, C., Volkmann, D.H. (1995). Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – a retrospective study. *Journal of South Africa Veterinary Association*, 66, 49-55.
- Oettle, E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 257-260.
- Olar, T.T., Bowen, R.A., Pickett, B.W. (1989). Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, 31, 451-461.
- Pereira, B.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M. (2001). Comparação da monta natural e inseminação artificial com sêmen diluído em água de coco em cadelas da raça Boxer. *Ciência Animal*, 11 (2), 97-100.
- Pineda, M.H., Kainer, R.A., Faulkner, L.C. (1973). Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. *American Journal of Veterinary Research*, 34, 1487-1491.
- Pinto, C.R.F., Eilts, B.E., Paccamonti, D.L. (1998). The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology*, 50, 301-305.
- Pinto, C.R.F., Paccamonti, D.L., Eilts, B.E. (1999). Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, 52, 609-616.
- Polge, C., Smith, A.U., Parkers, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, 164, 166.
- Platz, C.C., Seager, S.W.J. (1977). Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Laboratory Animal Science*, 27, 1013 – 1016.
- Province, C.A., Amann, R.P., Pickett, B.W., Squires, E.L. (1984). Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*, 22, 409-415.
- Ravaszova, O., Mesaros, P., Cingakova, V., Lukacinova, M. (1996). A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage. *Folia Veterinaria*, 40, 95-99.
- Rodrigues-Martinez, H., Ekwall, H., Linde-Forsberg, C. (1993). Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 279-285.
- Rota, A., Iguer-Ouada, M., Versteegen, J., Linde-Forsberg, C. (1999). Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, 51 (6), 1045-1058.
- Santos, S.E.C., Vannucchi, C.I., Satzinger, S., Visintin, J.A. (2001). Comparação de dois crioprotetores na congelação de sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25(3), 472-473.
- Schutte, A.P. (1967). Canine Vaginal Cytology -II. Cyclic Changes. *Journal of Small Animal Practice*, 8, 307-311.

- Seager, S. W. J., Platz, C. C. (1977). Artificial insemination and frozen semen in the dog, *Veterinary Clinics of North America*, 7, 757-764.
- Seager, S.W.J., Fletcher, W.S. (1972). Collection, storage and insemination of canine semen. *Laboratory Animal Science*, 22, 177-182.
- Seager, S.W.J. (1986). Artificial insemination in dogs. Em: *Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment*, Ed. T.J. Burke. Lea & Febiger, Philadelphia. Pp. 207-210.
- Seager, S.W.J. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *Artificial Insemination Digest*, 17-26.
- Shin, N.S., Moon, Y.S., Chung, D.H., Kim, Y.J. (1997). Artificial insemination with frozen canine semen using vaginal endoscope. *Korean Journal of Veterinary Clinical Medicine*. 14(2), 297-300.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M. (2000). Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. *Ciência Rural*, 6, 1021-1025.
- Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2002a). Uso da sonda de Osiris na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Rottweiler. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 5, 147-149.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59, 821-829.
- Silva, L.D.M. (1995) Procréation medicalement assistée dans l'espèce canine. Investigations morpho-fonctionnelles et optimisation des techniques permettant d'arriver à la maîtrise de la reproduction. Tese (Doutorado) Université de Liège, Liège, 173p.
- Silva, L.D.M. (2001). Avanços da inseminação artificial na espécie canina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25 (2), 107-111.
- Silva, L.D.M., Onclin, K., Versteegen, J.P. (1996). Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 37, 4, 313-320.
- Silva, L.D.M., Silva, A.R., Cardoso, R.C.S. (2002b). Inseminação artificial em cães. Em: *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. Eds. P.B.D. Gonsalves, J.R.F. Figueiredo, V.J.F. Freitas. Varela, São Paulo. Pp.69-95.
- Stornelli, M.A., Stornelli, M.C., Arauz, M.S., Savignone, C.A., García, M., De La Sota, R.L. (2001). Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado refrigerado a 4°C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25 (3), 468-470.
- Ström, B., Rota, A., Linde-Forsberg, C. (1997). In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*. 48, 247-256.
- Tsutsui, T. (1989). Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 39, 269-275.
- Tsutsui, T.; Kawakami, E. Murao, I. Ogasa, A. (1989). Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 51, 560-565.
- Tsutsui, T., Hase, M., Tanaka, A., Fujimura, N., Hori, T., Kawakami, E. (2000). Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk Tris-fructose citrate. *Japanese Veterinary Medical Science*, 62, 603-606.
- Uchoa, D.C., Silva, A.R., Silva, T.F.P., Silva, L.D.M. (2001). Inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Bassethound utilizando a Sonda de Osiris®. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 25 (3), 371-373.
- Watson, P.F., Plummer, J.M. (1985). The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. *Proceedings 1st. International Conference on Deep Freezing of Boar Semen*, 113-117.
- Wayne, R.K., Vila, C. (2001). Phylogeny and origin of the domestic dog. Em: *The genetics of the dog*, Eds. A. Ruvinsky, J., Sampsom, CAB International. Pp. 1-13.
- Wilson, M.S. (1993). Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen, *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 307-311.

3. JUSTIFICATIVA

A partir da revisão de literatura apresentada, pode-se perceber que nas últimas duas décadas, um grande avanço foi alcançado no que diz respeito ao desenvolvimento de biotécnicas da reprodução aplicadas a cães e, em particular, no que se refere à tecnologia de sêmen canino. Entretanto, os resultados obtidos com as técnicas de criopreservação de sêmen canino ainda são deveras heterogêneos.

O interesse de companhias comerciais como a *International Canine Genetics* (Philadelphia, USA), aliado aos recursos humanos aperfeiçoados nas universidades, possibilitam hoje a implantação de bancos de sêmen canino congelado em alguns países, os quais tentam constantemente aprimorar as técnicas de congelação já existentes ou mesmo desenvolver novas técnicas visando obter uma perda mínima da qualidade espermática durante o processamento.

Esses estudos acerca da criopreservação de sêmen, além de serem importantes para a própria espécie canina, têm servido como base para as pesquisas relacionadas à indústria de curtume européia. Esta indústria é proprietária de fazendas onde se criam canídeos outros, como a Raposa Azul (*Alopex lagopus*) e a Raposa Prateada (*Vulpes vulpes*), visando a preservação e multiplicação do material genético de animais portadores de genes mutantes de alto valor comercial (Farstad, 1996). Conforme esse ponto de vista, as pesquisas em tecnologia do sêmen canino abrem a perspectiva de serem adaptadas à preservação de espécies caníneas ameaçadas de extinção, como o Lobo Guará (*Chrysocyon brachyurus*), a Raposinha do Campo (*Pseudalopex sp.*) e o Cachorro Vinagre (*Speotus venaticus*).

Nesse sentido, em trabalhos anteriores (Silva *et al.*, 1998;2000;2002cd; 2003), foi adaptada para a espécie canina, no uso do diluente Tris, uma metodologia inicialmente desenvolvida para a conservação do sêmen caprino utilizando o diluente à base de água de coco (Nunes *et al.*, 1997). Entretanto, são ainda necessários alguns ajustes que proporcionem uma maior praticidade ao uso dessa metodologia, tais como a definição da temperatura de adição de glicerol e o estudo da diluição de sêmen. Além disso, esses trabalhos anteriores se baseavam em resultados avaliados apenas pela análise clássica da motilidade e morfologia espermática, sendo

então aqui proposta a aplicação de testes mais avançados, como a microscopia eletrônica, análise computadorizada e teste de interação espermatozoides-oócitos, com o intuito de avaliar a eficiência dessa metodologia.

Apesar de diversos testes que avaliam diferentes parâmetros relacionados à qualidade das amostras de sêmen já terem sido desenvolvidos, existe ainda uma carência de estudos acerca das relações entre os mesmos, no que se refere ao sêmen canino. O estabelecimento dessas relações seria importante não apenas por permitir a padronização de um teste *in vitro* capaz de prever a fertilidade *in vitro* e/ou *in vivo* de uma amostra de sêmen, mas também por proporcionar uma maior compreensão das relações entre os diferentes parâmetros avaliados nas amostras de sêmen.

Diante do exposto, justifica-se a realização dos experimentos reportados na presente tese.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- ? O sêmen canino destinado à criopreservação poderia ser eficientemente diluído segundo o método de concentração pré-fixada ou aquele baseado em um volume fixo.
- ? A adição do diluente glicerolizado ao sêmen à temperatura ambiente (27°C) não traria prejuízos à célula espermática e poderia conferir maior praticidade ao procedimento de criopreservação.
- ? Poderiam existir relações entre as análises de diferentes parâmetros do sêmen canino congelado e suas interações com oócitos homólogos.

5. OBJETIVOS

5.1. Geral

- ? Aprimorar uma metodologia de congelação de sêmen canino utilizando o diluente Tris e avaliar seus efeitos sobre diferentes parâmetros seminais.

5.2. Específicos

- ? Verificar o efeito da diluição espermática sobre a qualidade seminal após descongelação;
- ? Observar a influência da temperatura de adição de glicerol durante o procedimento de criopreservação sobre a qualidade seminal após descongelação;
- ? Determinar o efeito da adição de diluente após a descongelação sobre a qualidade e longevidade espermática;
- ? Verificar a existência de relações entre os parâmetros seminais com as interações *in vitro* dos espermatozoides caninos congelados e oócitos homólogos;
- ? Avaliar os efeitos da criopreservação sobre diferentes parâmetros morfológicos e sobre a aparência ultra-estrutural de células espermáticas caninas.

6. CAPÍTULO 01

**Comparison between different dilution rates on canine semen freezing
using Tris-buffer with the addition of egg-yolk and glycerol**

**Comparação entre diferentes diluições na congelação do sêmen canino utilizando o tampão
Tris acrescido de gema de ovo e glicerol**

Brazilian Journal of Veterinary Medicine and Animal Science

***In Press*, Ref. 1095/04**

(Aceito para publicação em 23 de Junho de 2005)

RESUMO

Compararam-se a concentração espermática padronizada e a expansão volume:volume na diluição do sêmen canino para congelação. O sêmen de seis cães, submetidos a duas coletas por estimulação manual, foi avaliado e diluído em tris acrescido de gema de ovo e glicerol, de acordo com duas diferentes diluições. A primeira baseou-se na concentração espermática padronizada de 200×10^6 espermatozóides/ml, e a segunda mediante diluição volume:volume, na proporção de uma parte de sêmen para uma de diluente. O sêmen foi congelado, armazenado em nitrogênio líquido e descongelado após uma semana. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados a cada etapa do processo e aos 15 e 30 min após descongelação. A morfologia espermática foi avaliada após coleta e descongelação. Nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos após a descongelação quanto à motilidade, vigor, porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais e longevidade. Ambas as taxas de diluição podem ser eficientemente utilizadas na congelação do sêmen canino.

Comparison between different dilution rates on canine semen freezing using Tris-buffer with the addition of egg-yolk and glycerol

[*Comparação entre diferentes diluições na congelação do sêmen canino utilizando o tampão tris acrescido de gema de ovo e glicerol*]

A.R. Silva, R.C.S. Cardoso, L.D.M. Silva

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária
Universidade Estadual do Ceará
Avenida Paranjana, 1700 - Itaperi
60740-000 – Fortaleza, CE

ABSTRACT

?

Standardized sperm concentration and volume:volume extension were compared as dilution rates for canine semen freezing. Six proven stud dogs were submitted to two seminal collections by manual stimulation. Semen was evaluated and extended in tris plus egg-yolk and glycerol according to two different dilution rates. The first one was based on a standardized sperm concentration of 200×10^6 spermatozoa/ml and the second was a volume:volume extension at a proportion of one part semen to one part extender. Semen was frozen, stored in liquid nitrogen and thawed after one week. Sperm motility and vigor were appraised after each stage of the process and at 15 and 30 min post-thawing. Sperm morphology was analyzed after collection and thawing. No differences were observed between treatments after thawing regarding sperm motility and vigor, normal sperm morphology rate or longevity. Both dilution rates can be efficiently used for canine semen freezing.

Keywords: dog, semen, extender, freezing, dilution

RESUMO

Compararam-se a concentração espermática padronizada e a expansão volume:volume na diluição do sêmen canino para congelação. O sêmen de seis cães, submetidos a duas coletas por estimulação manual, foi avaliado e diluído em tris acrescido de gema de ovo e glicerol, de acordo com duas diferentes diluições. A primeira baseou-se na concentração espermática padronizada de 200×10^6 espermatozoides/ml, e a segunda mediante diluição volume:volume, na proporção de uma parte de sêmen para uma de diluidor. O sêmen foi congelado, armazenado em nitrogênio líquido e descongelado após uma semana. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados a cada etapa do processo e aos 15 e 30 min após descongelação. A morfologia espermática foi avaliada após coleta e descongelação. Nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos após a descongelação quanto à motilidade, vigor, porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais e longevidade. Ambas as taxas de diluição podem ser eficientemente utilizadas na congelação do sêmen canino.

Palavras-chave: cão, sêmen, diluidor, congelação, diluição

INTRODUCTION

Nowadays, some chilling methods have been yielding expressive results in conserving canine semen for several days (Iguer-Ouada, 2001), allowing semen exchange between countries. However, cryopreservation continues to be an important tool for the conservation of genetic material from valuable stud dogs for an indefinite time. Moreover, due to phylogenetic similarities between the domestic and non-domestic canids, the former are used as an experimental model for the latter, mainly because of the lack of availability of non-domestic canids for use in experiments (Goodrowe *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2004). For this reason, scientific research has been carried out in an attempt to improve different protocols for this procedure by using different cryoprotective agents (Soares *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003), extenders (Bueno *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2003), freezing/thawing processes, and several dilution rates (England, 1993).

In general, investigations on canine semen technology use a dilution rate based on a standardized sperm concentration. The advantage of this method is that it is simpler to calculate the number of spermatozoa per straw, allowing the preparation of semen doses for artificial insemination. Furthermore, standardized concentration allows the researcher to determine the exact proportion between the extender and the sperm cells. Several authors have reported the use of sperm concentrations ranging from 100 (Tsutsui *et al.*, 2000; Bueno *et al.*, 2001), 200 (Sirivaidyapong *et al.*, 2001), 400 and 800×10^6 spermatozoa/ml (Peña and Linde-Forsberg, 2000) for canine semen freezing.

On the other hand, other investigators have been conducting their work based on a volume:volume extension. By this method, there is no need to count spermatozoa using counting chambers or expensive methods such as spectrophotometry or computer assisted semen analysis. The absence of this step on the methodology renders it more practical, reducing the time and the costs involved in canine semen freezing. Thus, some authors have been using dilutions consisting of one part semen to: one part extender (Cardoso *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003), two parts extender (Silva and Versteegen, 1995), three parts extender (Yildiz *et al.*, 2000) and four parts extender (England and Ponzio, 1996).

According to England (1993), the standardized sperm concentration method neglects the effect of dilution upon sample viability and the variation in extender constituent concentration. Indeed, the studies that use variable dilution rates do not make accurate comparisons between extenders, as final concentrations are often unknown. There is no evidence that the relationship between chemical concentration and sperm concentration is important; thus, if the final concentration of the chemical is relevant, studies should utilize volume:volume dilutions of semen with an extender.

In view of the controversial information concerning the ideal dilution rate for canine semen, the objective of the present study was to compare standardized sperm concentration and volume:volume extension as dilution rates for canine semen freezing using a tris-buffer extender containing egg-yolk and glycerol.

MATERIAL AND METHODS

Six proven stud dogs from private kennels were selected for this experiment: one Dobermann, one American Staffordshire Terrier, one Rottweiler, one Brazilian Mastiff and two Boxers. The dogs were aged from one to six years. The animals were maintained in individual boxes and fed dry food once daily, with free access to water.

Each dog was submitted to two seminal collections by manual stimulation. Ejaculates were collected into a funnel coupled to a graduated tube and fractions were separated by color modification (Johnston *et al.*, 2001). The sperm-rich fraction was evaluated and later individually frozen. Semen volume, color and viscosity were grossly evaluated. Sperm motility (percentage of mobile spermatozoa) and vigor (sperm motility status), scored on a scale from 0 (without movement) to 5 (fast progressive movement), were evaluated by light microscopy (100x). Sperm morphology was evaluated by microscopic analysis (1000x) of a slide stained with eosin-nigrosin, counting 200 cells per slide. Morphologic sperm abnormalities were classified according to Johnston *et al.* (2001). Sperm concentration was determined with a Neubauer counting chamber.

Only samples that presented a volume =0.6ml, concentration $>200 \times 10^6$ spermatozoa/ml, sperm motility =80% and vigor =4 were used in the

experiment. Samples were divided in two aliquots. The first was submitted to dilution according to standard sperm concentration. After determination of sperm concentration in fresh semen, the needed extender volume was calculated by the formula: $V_1 C_1 = V_2 C_2$, where V_1 is the initial volume, C_1 the initial concentration in fresh semen, V_2 the final volume after extension, and C_2 , the final sperm concentration, which was standardized as 200×10^6 spermatozoa/ml. The second aliquot was submitted to volume:volume extension based on a proportion of one part semen to one part extender (1:1).

An extender consisting of 3.028g tris-hydroxy-methyl-aminomethane, 1.78g monohydrated citric acid and 1.25g D-fructose, dissolved in 100ml distilled water (Silva *et al.*, 2002) was used. The osmosis of this solution was 305mOsm/l and the pH 6.6. Twenty percent of this solution was then replaced with egg-yolk and the extender was divided into two equal portions. The first portion did not contain the cryoprotector and was added to semen at 27°C. The second contained 12% glycerol and was added to semen when both reached 4°C. After addition, the final glycerol concentration was 6%.

Semen was frozen by adding the first portion of the extender to the semen at 27°C immediately after the initial analysis. A cooling period was then allowed when the semen was maintained in a thermal box at 15°C for 40min, at a cooling rate of 0.30°C/min. The semen was then transferred to a refrigerator for a further 30 min, where it reached 4°C at 0.37°C/min. At the end of this time, a second portion of extender containing glycerol was added to the sample and sperm was packed into 0.25ml plastic straws. Finally, all straws were horizontally placed in a thermal box for 5min, 5cm above the liquid nitrogen (N_2) level, reaching a temperature close to -70°C in vapor and then plunged into liquid N_2 . After one week, the semen was thawed in a water bath at 38°C/1min and kept there for 30min for a thermoresistance test (Silva *et al.*, 2003).

Sperm motility and vigor were appraised after collection, first dilution, cooling, glycerol addition, immediately after thawing and at 15 and 30min post-thawing on a glass slide over a warmed plate coupled to a light microscope. Sperm morphology was analyzed after semen collection and thawing.

The results were expressed as mean and standard deviation and were analyzed by the Statview 5.0 software (Statview, 1998). Percentage data concerning to sperm motility and morphology were subjected to arcsine transformation. Differences among the seminal parameters of dogs were analyzed by the Kruskal-Wallis test. The effects of the dilution rates on sperm motility and morphology, as well as the effects of the incubation period on motility were evaluated by the Student *t*-test. The effects of dilution rates and incubation period on vigor were analyzed by the Mann-Whitney- test. The results were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Fresh dog semen was white in color with milky viscosity. Values for sperm motility, vigor, concentration and morphology, as well as second fraction volume are shown in Table 1. Statistical analysis showed that dogs were a homogeneous population, since no differences were detected among them ($P > 0.05$). Furthermore, seminal parameters were in the normal range for canine species (Oettlé, 1993; Johnston *et al.*, 2001).

Fig. 1 and 2 show similar patterns of sperm motility and vigor for both dilution rates throughout extension, cooling, glycerol addition and thawing. After thawing, a reduction in motility and vigor was observed in both treatments, which showed no difference from each other ($P > 0.05$). It is possible that the reduction of seminal quality after thawing was due to a sum of factors, such as the crystallization phase that occurs between -6 and -10°C, whose effect is reduced by the addition of the cryoprotector (Colas, 1975); the toxic action of glycerol, which can cause physical-chemical alterations that lead to the rupture of the sperm membrane or the removal of important membrane proteins in spite of having protective effects on the sperm cell; the osmotic alterations originating from the addition of the cryoprotector and the ionic rearrangement that occurs during freezing; the alterations in the lipid-protein bilayer and modifications in the membrane enzymes of the sperm cell (Holt, 2000); and the thermal shock due to the several temperature changes to which sperm are subjected (Farstad, 1996). Many researchers have used sperm motility as the main parameter for the evaluation of freezing/thawing techniques applied to canine semen (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997; Bueno *et al.*, 2001). In this study, the percentage of mobile

spermatozoa obtained after thawing using both dilution rates (60%) was within the ideal range for the performance of artificial insemination

using frozen semen (Concannon and Battista, 1989).

Table 1. Means and standard deviation of the characteristics of two ejaculates obtained from donor stud dogs

Dog	Sperm motility (%)	Sperm vigor (0-5)	Concentration ($\times 10^6$ spermatozoa/ml)	Normal sperm (%)	2 nd fraction volume (ml)
1	95.0 \pm 0.0	5.0 \pm 0.0	1250.0 \pm 70.7	77.5 \pm 8.5	0.9 \pm 0.1
2	97.5 \pm 3.5	5.0 \pm 0.0	520.0 \pm 113.1	76.0 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1
3	92.5 \pm 3.5	5.0 \pm 0.0	885.0 \pm 502.1	78.3 \pm 6.7	1.6 \pm 0.8
4	95.0 \pm 0.0	5.0 \pm 0.0	1370.0 \pm 650.5	80.3 \pm 3.2	2.4 \pm 2.1
5	99.0 \pm 1.4	5.0 \pm 0.0	2760.0 \pm 28.3	79.8 \pm 1.1	1.9 \pm 0.1
6	100.0 \pm 0.0	5.0 \pm 0.0	1740.0 \pm 367.7	81.3 \pm 5.3	1.1 \pm 0.2
Total	96.5 \pm 0.9	5.0 \pm 0.0	1420.8 \pm 228.3	79.2 \pm 1.4	1.4 \pm 0.3

No statistical differences were observed among dogs ($P > 0.05$; Kruskal-Wallis test).

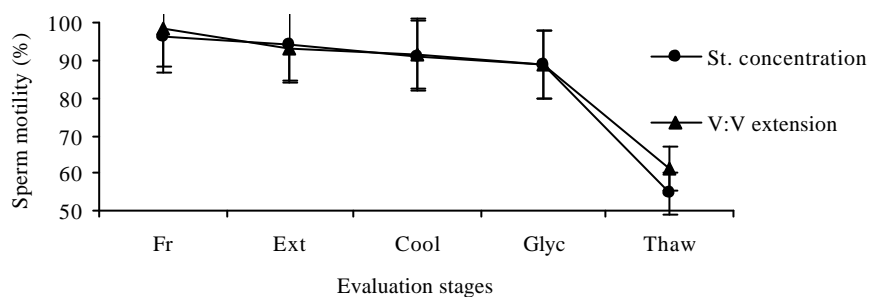


Figure 1. Sperm motility of fresh (Fr), extended (Ext), cooled (Cool), glycerol-supplemented (Glyc) and frozen/thawed (Thaw) semen, submitted to standardized sperm concentration (St. concentration) or volume:volume extension (V:V extension - $P > 0.05$; Student's t test).

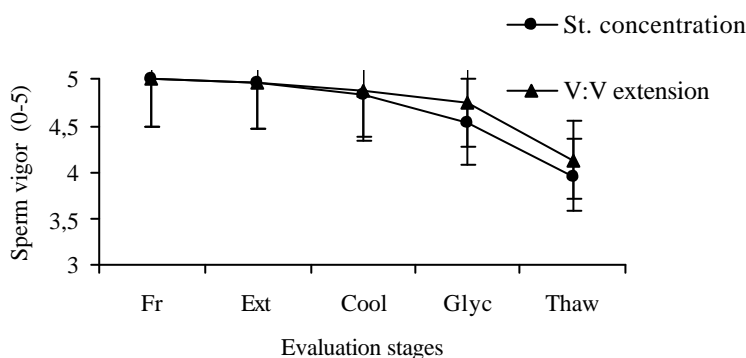


Figure 2. Sperm vigor of fresh (Fr), extended (Ext), cooled (Cool), glycerol-supplemented (Glyc) and frozen/thawed (thaw) semen, submitted to standardized sperm concentration (St. concentration) or volume:volume extension (V:V extension - $P > 0.05$; Mann-Whitney test).

The effects of semen incubation at 38°C for 30min are shown in Tables 2 and 3. During the thermoresistance test, sperm motility declined

significantly 15min after thawing in both treatments, but vigor only declined at 30min ($P < 0.05$). However, at 15min, both parameters

were still within the acceptable range (30 – 50%) for the use of frozen semen for insemination (Concannon and Battista, 1989). Furthermore, 15min is more than enough time for the semen to reach the fertilization site, since Tsutsui *et al.* (1989) showed that canine spermatozoa can reach the uterine horn 2min after vaginal deposition. On the other hand, post-thawing dilution could improve sperm longevity, as shown by other authors (Ström *et al.*, 1997; Peña and Linde-Forsberg, 2000).

Table 2. Sperm motility of thawed canine semen submitted to standardized sperm concentration or volume:volume extension and maintained at 38°C for 30 minutes

Evaluations post thawing (min)	Sperm motility (%)	
	Standardized concentration	V:V extension
0	54.6 ± 11.2a	61.3 ± 9.1a
15	41.3 ± 10.9b	44.6 ± 13.1b
30	26.3 ± 16.5c	31.3 ± 15.4c

Values followed by different lower case letters differ between rows (P<0.05; Student's t test); no differences between columns were observed (P>0.05; Student's t test).

Table 3. Sperm vigor of thawed canine semen submitted to standardized sperm concentration or volume:volume extension and maintained at 38°C for 30 minutes

Evaluations post thawing (min)	Sperm vigor (0-5)	
	Standardized concentration	V:V extension
0	4.0 ± 0.3a	4.1 ± 0.2a
15	3.8 ± 0.4a	3.8 ± 0.7a
30	2.6 ± 1.2b	3.0 ± 1.1b

Values followed by different lower case letters differ between rows (P<0.05; Man-Whitney test); no differences between columns were observed (P>0.05; Man-Whitney test).

In human species (Alvarez *et al.*, 1996), the thermoresistance test has been shown to be a safe clinical test to predict the fertilizing potential of semen. However, in the dog, Ström *et al.* (1997) stated that low sperm longevity is not necessarily associated with low fertility. These authors found a high sperm motility after thawing (74%), but semen showed low longevity (20% after 1h at 37°C). However, a fertility rate of 85% was obtained in intra-uterine artificial insemination. Thus, the existence of a correlation between post-thawing sperm longevity and *in vivo* fertility rate needs to be confirmed.

Even if the dogs used in this experiment initially constituted a homogeneous population (Table 1), wide individual variability was observed in response to the freezing procedure and in the thermoresistance test, with 30-70% variation in sperm motility immediately after thawing, and a 0-50% variation at 30min. According to Yu *et al.* (2002), one aspect of sperm cryobiology that is different from other types of cells is the fact that spermatozoa from different individuals may exhibit significantly different responses to the same freezing treatment, which has also been observed among dogs (Silva *et al.*, 2003).

Oettlé (1993) described the relationship between the percentage of morphologically normal spermatozoa and fertility in dogs. This author verified that samples with less than 60% morphologically normal sperm population rate would cause a significant reduction in fertility. Concerning this parameter, in the present study no differences were observed between fresh and thawed semen for either treatment (P>0.05) regarding normal sperm morphology rate, which was higher than 70% (Table 4). This shows that the freezing protocols were efficient in preserving sperm morphology, regardless of the dilution rate. Detached sperm heads were the most frequent abnormality found both in fresh and in frozen semen. However, by analyzing separately each sperm abnormality, a higher incidence of kinked and coiled tails was verified in both treatments compared to fresh semen (P<0.05). This finding was probably due to the cold shock effect or to glycerol exposure, as reported for red wolves (Goodrowe *et al.*, 1998). Moreover, a freezing procedure using volume:volume extension showed a low incidence of proximal droplets (P<0.05). Possibly, freezing/thawing procedures damaged the droplet membrane releasing its enzymes, which could have adverse effects on semen viability. Even if no acrosome abnormality was seen in fresh semen, no differences were found between fresh and frozen semen (P>0.05). The staining method used in this experiment was not efficient in showing internal acrosome details, and only acrosome detachment was verified in frozen semen. Finally, a higher rate of bent midpieces was verified in fresh than in frozen semen using a standardized concentration (P<0.05). This is an uncommon fact that is difficult to explain since this abnormality was not verified in three ejaculates after freezing, which randomly reduces the normal distribution of bent midpieces.

Table 4. Sperm morphology observed in canine fresh and frozen-thawed semen submitted to standardized sperm concentration or volume:volume extension

	Sperm morphology (%)		
	Fresh	Standardized concentration	V:V extension
Normal sperm	79.2 ? 1.4	76.5 ? 4.8	74.3 ? 6.9
Head abnormalities			
Detached head	11.6 ? 3.2	10.8 ? 2.2	12.2 ? 3.3
Double head	0.4 ? 0.2	0.0 ? 0.0	0.4 ? 0.2
Macrocephalic	0.1 ? 0.2	0.3 ? 0.6	0.1 ? 0.2
Microcephalic	0.1 ? 0.3	0.1 ? 0.2	0.0 ? 0.0
Pyriform head	0.3 ? 0.4	0.2 ? 0.5	0.2 ? 0.4
Detached acrosome	0.0 ? 0.0	0.3 ? 0.5	0.1 ? 0.2
Midpiece abnormalities			
Thickened midpiece	0.0 ? 0.0	0.0 ? 0.0	0.1 ? 0.2
Bent midpiece	2.3 ? 1.7A	0.9 ? 0.9B	1.3 ? 0.9AB
Proximal droplet	0.2 ? 0.3A	0.1 ? 0.2AB	0.0 ? 0.0B
Distal droplet	0.1 ? 0.2	0.0 ? 0.0	0.0 ? 0.0
Abaxial insertion	0.3 ? 0.4A	0.0 ? 0.0B	0.1 ? 0.2B
Tail abnormalities			
Kinked tail	1.7 ? 1.1A	4.3 ? 1.7B	4.3 ? 2.4B
Coiled tail	4.0 ? 1.5A	6.0 ? 2.9B	6.8 ? 2.9B
Strongly coiled tail	0.5 ? 1.1	0.6 ? 1.2	0.6 ? 1.0
Double	0.0 ? 0.0	0.1 ? 0.2	0.1 ? 0.1

Values followed by different capital letters differ among columns ($P < 0.05$; Student's t test).

According to the dilution rates, no differences were verified in the seminal characteristics, except for some morphological abnormalities. In addition, while the standard sperm concentration was always 200×10^6 spermatozoa/ml, the final sperm concentration in volume:volume extension ranged from 220 to 1390×10^6 spermatozoa/ml, with an average of $684.1 \pm 403.6 \times 10^6$ spermatozoa/ml. In general, special attention should be given to dilution rate, which seems to be an important factor influencing semen viability after the freezing/thawing process. Mann (1964) suggested that excessive dilution leads to permanent loss of motility, metabolic activity and fertilizing capacity *in vivo*. The mechanism of sperm inactivation by excessive dilution resembled senescence of spermatozoa during storage as a result of cold shock, because there is evidence that such treatments do indeed result in the destabilization of sperm membranes and impairment of their function. Furthermore, recent reports have shown that seminal plasma proteins are important for the maintenance of semen viability in rams, preventing cold-shock damage to the spermatozoal membrane (Barrios *et al.*, 2000; Pérez-Pé *et al.*, 2001). In dogs, an excessive dilution could minimize the beneficial

effects of proteins from testicular and epididymal fluids present in sperm fraction. In fact, very high dilution rates, such as one part of semen to 16 or 32 parts extender, cause a significant decrease in sperm progressive motility (Wales and White, 1963; England, 1993). Otherwise, for stallion semen, Varner *et al.* (1987) reported that dilution rates based in a lower standardized concentration of 25×10^6 spermatozoa/ml improved the longevity of spermatozoa motility and showed better results than dilutions in greater sperm concentrations such as 50 and 100×10^6 spermatozoa/ml. Thus, further studies must be conducted in order to determine the efficiency of other dilution rates using other extenders and freezing/thawing procedures for canine semen.

In conclusion, a sperm concentration standardized at 200×10^6 spermatozoa/ml and volume:volume extension at one part semen to one part extender are efficient dilution rates for canine semen freezing.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Capes and CNPq for financial support and DVM Daniel C. Uchoa (Grande Canafístula Kennel) for providing the animals used in the experiment.

REFERENCES

- ALVAREZ, J.G.; MINARETZIS, D.; BRENT-BARRET, C. *et al.* The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive techniques. *Fertil. Steril.*, v.65, p.400-405, 1996.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M. *et al.* Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.*, v.63, p.1531-1537, 2000.
- BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. *et al.* Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães – Efeito do meio diluidor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, p.364-371, 2001.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C. *et al.* Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, v.59, p.743-751, 2003.
- COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. *J. Reprod. Fertil.*, v.42, p.277-285, 1975.
- CONCANNON, P.W., BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK R.W. (Ed.), *Current veterinary therapy*. Philadelphia: WB Saunders, 1989. p.1247-1259.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fertil.*, v.47, p.243 – 255, 1993.
- ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, v.46, p.165-171, 1996.
- FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, p.251-260, 1996.
- GOODROWE, K.L.; HAY, M.A.; PLATZ, C.C. *et al.* Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.53, p.299-308, 1998.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
- IGUER-OUADA, M. *Medically assisted procreation in canine species: analyses and 4°C preservation of semen*. 2001. 219f. Tese (Doutorado) - Université de Liège, Liège.
- 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.1343-1349, 1997.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: W.B.Saunders, 2001. 592p.
- MANN, T. *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. London: Methuen, 1964. 493p.
- OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil.*, v.47, p.257-260, 1993.
- PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.703-718, 2000.
- PÉREZ-PÉ, R.; CÉBRIAN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.56, p.425-434, 2001.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C. *et al.* Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *Vet. J.*, v.164, p.244-246, 2002.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C. *et al.* 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.; MORATO, R.G.; SILVA, L.D.M. The potential of gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim. Reprod. Sci.*, v.81, p.159-175, 2004.
- SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen thawed

spermatozoa. *Theriogenology*, v.44, p.571-579, 1995.

SIRIVAIDYAPONG, S.; URSEN, P.; BEVERS, M.M. *et al.* Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.57, p.383-386, 2001.

SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A. *et al.* Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. *Ciêñ. Rural*, v.32, p.649-655, 2002.

STATVIEW Version 5.0: statview reference. Cary: SAS Institute, 1998. 528p.

STRÖM, 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.

TSUTSUI, T.; HASE, M.; HORI, T. *et al.* Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *J. Vet. Med. Sci.*, v.62, p.537-538, 2000.

TSUTSUI, T.; KAWAKAMI, E.; MURAO, I. *et al.* Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v.51, p.560-565, 1989.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. *et al.* Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v.28, p.709-723, 1987.

WALES, R.G.; WHITE, I.G. Viability of diluted dog spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, v.5, p.67-76, 1963.

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

YU, I.; SONGSANSSEN, N.; GODKE, R.A. *et al.* Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, v.44, p.62-78, 2002.

7. CAPÍTULO 02

**Influence of temperature for glycerol addition and post thaw dilution on
the quality of canine frozen semen**

**Influência da temperatura de adição de glicerol e diluição pós-descongelação
na qualidade do sêmen canino congelado**

Reproduction in Domestic Animals

In Press, Ref. RDA 630

(Aceito para publicação em 29 de julho de 2005)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi comparar a temperatura ambiente (27°C) e a de 4°C para a adição de glicerol na criopreservação de sêmen canino e verificar o efeito de diferentes diluições pós-descongelação sobre o sêmen canino. Dez ejaculados oriundos de cinco cães foram coletados por manipulação digital. As amostras de sêmen foram avaliadas e posteriormente divididas em duas alíquotas. A primeira alíquota foi diluída em Tris-gema-glicerol a 27°C e a segunda recebeu o glicerol a 4°C. As amostras foram congeladas e estocadas em nitrogênio líquido. Após uma semana, as amostras foram descongeladas e submetidas à avaliação de motilidade espermática progressiva, morfologia, integridade acrossomal, teste hipo-osmótico (HOST) e teste de termorresistência. Para o teste de termorresistência, as alíquotas foram divididas em duas porções: uma porção foi mantida sem diluição e a outra foi diluída na proporção de uma parte de sêmen para quatro partes de diluente (1:4). Nenhuma diferença foi observada entre as temperaturas de adição de glicerol no que se refere aos parâmetros seminais avaliados. Além disso, as diluições pós-descongelação demonstraram efeitos similares sobre a longevidade espermática canina. Correlações entre a motilidade espermática pós-descongelação e os resultados do HOST e do teste de termorresistência foram observadas em ambas as temperaturas de adição de glicerol. Em conclusão, o glicerol pode ser adicionado ao sêmen canino à temperatura ambiente (27°C) ou a 4°C. Ademais, não existe necessidade de diluir o sêmen após a descongelação para realização do teste de termorresistência, mas se for necessário aumentar o volume para inseminações artificiais, a adição do diluente não vai prejudicar o sêmen.

Influence of Temperature during Glycerol Addition and Post-Thaw Dilution on the Quality of Canine Frozen Semen

AR Silva, RCS Cardoso and LDM Silva

Laboratory of Carnivore Reproduction – State University of Ceará, Fortaleza, Brazil

Contents

The aim of the present study was to compare room temperature (27°C) and 4°C for glycerol addition on canine semen cryopreservation and verify the effect of different post thawing dilutions on canine semen. Ten ejaculates from five stud dogs were collected by digital manipulation. Semen samples were evaluated and further divided into two aliquots. The first aliquot was extended in Tris-egg yolk-glycerol at 27°C and the second one received glycerol at 4°C. Samples were frozen and stored in liquid nitrogen. After one week, samples were thawed and submitted to evaluations of progressive sperm motility, morphology, acrosomal integrity, hypo-osmotic swelling (HOST) and thermoresistance tests. For thermoresistance test, aliquots were divided in two portions: one portion was kept undiluted (1:0) and the other one was diluted in a one part semen to four parts extender (1:4) ratio. No differences were observed between temperatures for glycerol addition regarding seminal parameters evaluated. Furthermore, post-thawing dilutions demonstrated similar effect on canine semen longevity. Correlations among post-thaw sperm motility and HOST and results from thermoresistance test were observed for both temperatures for glycerol addition. In conclusion, glycerol could be added to canine semen at room temperature (27°C) or at 4°C. Moreover, there is no need to extend canine semen after thawing for the thermoresistance test, but if we need to increase the inseminating volume for artificial inseminations, the addition of extender will not damage the semen.

Introduction

Glycerol (Polge et al., 1949) is the cryoprotectant most frequently used for semen cryopreservation in several species (Vidament et al., 2000; Gil et al., 2003), including the dog (Silva et al., 2002, 2003). However, some factors such as the concentration (Peña et al., 1998) and the form of glycerol addition (Silva et al., 2003) could influence semen cryopreservation. Moreover, temperature for glycerol addition remains as a controversial factor that has been revised in several species such as ovine (Vidament et al., 2000) and equine (Gil et al., 2003).

For canine species, there is scarce and controversial information concerning this subject. Some authors used glycerol addition at different temperatures, such as: at 37°C (Peña et al., 1998), at 35 °C (Nothling and Shuttleworth, 2005), at 32°C (Yildiz et al., 2000) or at room temperature (Rota, 1998). However, Foote (1982) reported that glycerol could be toxic to mammalian sperms when added at high temperatures in some media but not in others. According to Silva et al. (2003) and Rota et al. (2005), the addition of glycerol could be performed after cooling at 4°C. This procedure would reduce the exposure of sperm cell to cryoprotectant, decreasing its damage on spermatozoa. Anyway, there is a lack of studies comparing different temperatures for glycerol addition to canine semen.

The analysis of multiple parameters related to the functional and morphologic characteristics of spermatozoa increases the predictability of the fertilizing potential of a semen sample (Peña-Martinez, 2004). In this way, evaluation of practical and cheap tests such as acrosomal status (Rodrigues, 1997), hypo-osmotic swelling (England and Plummer, 1993) and thermoresistance (Strom et al., 1997) can also be used for this purpose. Peña and Linde-Forsberg (2000) evaluated methodologies for canine semen cryopreservation by thermoresistance test and suggested that sperm longevity is increased when post thaw dilutions are conducted. In addition, studies about post-thaw dilution are important also for understanding the behavior of thawed sperm when expansion is needed to increase inseminating volume for intra-vaginal artificial inseminations.

The aim of present study was to compare room temperature (27°C) and 4°C for glycerol addition on canine semen cryopreservation by correlating immediate post-thaw sperm motility and results from sperm morphology, acrosomal status, hypo-osmotic swelling and thermoresistance tests. Moreover, this work intends to verify the effect of different dilutions used for the thermoresistance test on frozen-thawed canine semen.

Material and Methods

Animals

Five proven stud Boxer dogs from a private kennel were selected for this experiment. The dogs were aged from one to six years. The animals were maintained in individual boxes and fed dry food once daily, with free access to water.

Semen collection and initial evaluation

Each dog was submitted to two seminal collections by manual stimulation in a one week interval. Ejaculates were collected into a funnel coupled to a graduated tube and semen fractions were separated by color modification. The sperm-rich fraction was evaluated and later individually frozen. Semen volume and color were grossly evaluated. Progressive sperm motility was evaluated by light microscopy (100x). Sperm cell morphology and acrosomal status were evaluated by phase-contrast microscopy (1000x) analyzing a slide stained with Bengal Rose (Rodrigues, 1997), counting 200 cells per slide. Sperm morphologic abnormalities were classified as primary and secondary (Silva et al., 2003). Sperm concentration was determined using a Neubauer counting chamber. Hypo-osmotic swelling and thermoresistance tests were performed after sperm collection and both are described later. Only the samples presenting a volume ≥ 0.6 mL, concentration $> 200 \times 10^6$ spermatozoa/mL, sperm motility $\geq 80\%$ and vigor ≥ 4 were used in the experiment.

Semen processing

An extender consisting of 3.028g Tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1.78g monohydrated citric acid and 1.25g D-fructose, dissolved in 100mL distilled water (Silva et

al., 2002) was used. The osmosis of this solution was 295mOsm/L and the pH 6.6. Twenty percent of this solution was then replaced by egg-yolk (V/V). During initial analysis, the semen remained at room temperature (27°C) for approximately 10 min and was divided into two aliquots. At 27°C, the first aliquot was extended in a ratio of one part semen to one part Tris-egg yolk plus 6% glycerol (Group 27°C); the second aliquot was initially extended at one part semen to a half part Tris-egg yolk, without glycerol (Group 4°C). Semen was kept in a thermal box for 40 min aiming to reach 15°C, at a cooling rate of -0.30°C/min. Samples were then transferred to a refrigerator for a further 30 min, where they reached 4°C at -0.37°C/min rate. After cooling, the second aliquot (Group 4°C) was added to the other half part Tris-egg yolk plus 12% glycerol also at 4°C, which provided a final concentration of 6% glycerol in the extender. Final dilution rate for both aliquots was one part semen to one part extender (1:1). Progressive sperm motility was reevaluated by light microscopy (100x) at this time. Samples were packed into 0.25mL plastic straws, which were placed horizontally in a thermal box for 5 min, 5cm above the liquid nitrogen (N₂) level, reaching a temperature close to -70°C in the vapor. Finally, straws were plunged into liquid N₂ for storage. One week later, samples were thawed in a water bath at 38°C/1 min and reevaluated.

Hypo-osmotic swelling test (HOST)

For the evaluation of sperm membrane function, a HOST (England and Plummer, 1993) was performed for fresh and frozen-thawed semen. A hypo-osmotic solution (150 mOsm/L), constituted by 7.35g sodium citrate plus 13.51g fructose dissolved in 1000mL distilled water, was used. After collection and immediately after thawing (Groups 4°C and 27°C), 0.01mL semen was diluted in 0.09mL hypo-osmotic solution and kept in a water bath at 38°C. After 45 min, a sperm aliquot was placed on a glass slide, covered by a coverslip and evaluated by microscopy under 400x magnification, counting 200 cells. Spermatozoa presenting swollen coiled tails were considered as presenting a functional sperm membrane.

Thermoresistance test

For the evaluation of sperm longevity, a thermoresistance test (Strom et al., 1997) was conducted for both fresh and frozen-thawed semen. After collection, one part fresh semen was diluted in four parts Tris-extender (1:4) and kept at 38 °C in water bath. Progressive sperm motility was evaluated at 30, 60, 90 and 120 minutes after dilution. Sperm morphology and acrosomal status were also evaluated immediately after semen collection and after 60 min.

Immediately after thawing, semen samples from both groups (27°C or 4°C) were divided into two aliquots that were kept at 38 °C in water bath. The first aliquot was kept undiluted (1:0) and the second was diluted in a one part thawed semen to four parts Tris-extender (1:4) ratio. Progressive sperm motility was evaluated immediately after and at 30, 60, 90 and 120 min after thawing. Sperm morphology and acrosomal status were evaluated immediately after thawing and after 60 min only in 1:4 diluted samples.

Statistical analysis

The results were expressed as mean and standard deviation and analyzed by the Statview 5.0 software (SAS Institute Inc., 1998). Percentage data were arcsine transformed. The effects of the temperature for glycerol

addition on progressive sperm motility, morphology, acrosome integrity and HOST as well as the effects of post thawing dilutions and incubation period on sperm motility and morphology were evaluated by the Student's t test ($P < 0.05$). To evaluate dog effect and its interactions with effects of temperature for glycerol addition, post thawing dilutions and incubation period on the variables studied, data were subjected to analysis of variance followed by Fisher's PSLD test ($P < 0.05$).

Presence of correlations among post thaw sperm motility and morphologically normal spermatozoa, normal acrosomes, HOST and sperm motility at 60 and 120 min were analyzed by Spearman's Correlation Test ($P < 0.05$) only for 1:4 diluted sample using both temperatures for glycerol addition (Groups 4°C and 27°C).

Results

Fresh dog semen was white-milky in color. The volume of sperm rich fraction was 0.71 ± 0.17 mL, with a sperm concentration of $1.07 \pm 0.37 \times 10^9$ spermatozoa/mL. Progressive sperm motility was $96.5 \pm 3.3\%$ spermatozoa. Sperm with normal morphology was $90.7 \pm 3.9\%$, with $98.0 \pm 1.5\%$ of acrosomal integrity.

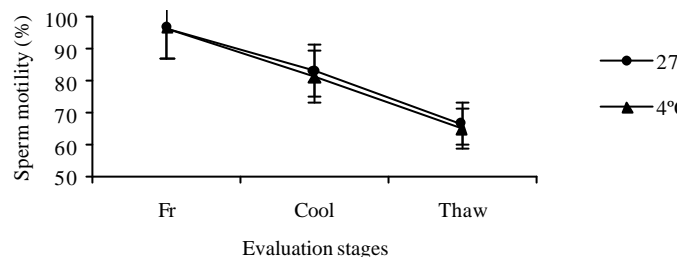


Fig. 1: Progressive sperm motility of fresh (Fr), cooled (Cool) and frozen/thawed (Thaw) semen submitted to glycerol addition at 27°C or 5°C ($P > 0.05$ - Student's t test)

No differences regarding progressive sperm motility (Figure 01) were observed between temperatures for glycerol addition after cooling period or after thawing ($P > 0.05$).

There was a significant decline ($P < 0.05$) in the normal spermatozoa percentage after thawing (Table 1), maybe due to a high incidence of secondary abnormalities, such as acrosomal defect and coiled tails, for both treatments. However, no difference was observed between the temperatures for glycerol addition ($P > 0.05$) regarding sperm morphology after thawing. Concerning acrosomal status (Table 2), a decline in the number of spermatozoa with normal acrosome was observed after thawing, when a high number of swelling acrosome was verified ($P < 0.05$), but no differences were observed between temperatures for glycerol addition ($P > 0.05$).

Regarding HOST, $96.7 \pm 1.0\%$ sperm with functional membrane were observed in fresh semen. A significant reduction ($P < 0.05$) in sperm membrane functionality was found after thawing for both treatments, although no differences were shown between temperatures for glycerol addition. Values of $33.5 \pm 9.1\%$ and $39.6 \pm 13.7\%$ reacting spermatozoa were observed after thawing for glycerol addition at 27° and 4°C, respectively.

Table 1: Sperm morphology (%) of fresh and frozen-thawed canine semen after glycerol addition at 27°C or 4°C evaluated immediately after semen collection or thawing and after 60min, under dilution of one part semen to four parts extender (1:4).

	Fresh semen		Frozen-thawed semen			
			Glycerol addition at 27°C		Glycerol addition at 4°C	
	0'	60'	0'	60'	0'	60'
Normal sperm	90.7 ± 4.0 ^A	88.4 ± 4.2 ^{AB}	86.3 ± 3.8 ^B	87.7 ± 4.2 ^B	86.9 ± 3.1 ^B	87.8 ± 5.1 ^B
Abnormalities						
Primary	1.9 ± 31.3	1.3 ± 0.6	1.3 ± 1.0	0.9 ± 1.0	1.2 ± 1.3	1.2 ± 1.2
Secondary	7.4 ± 4.1 ^A	10.3 ± 4.4 ^B	12.1 ± 4.1 ^B	11.4 ± 4.1 ^B	11.6 ± 3.7 ^B	11.0 ± 4.8 ^B
Total	9.3 ± 4.0 ^A	11.6 ± 4.2 ^{AB}	14.3 ± 4.0 ^B	12.3 ± 4.2 ^B	13.1 ± 3.2 ^B	12.2 ± 5.1 ^B

^{A,B} Values followed by different capital letters differ between columns ($P < 0.05$ - Student's t test)

Table 2: Acrosomal status (%) of fresh and frozen-thawed canine semen after glycerol addition at 27°C or 4°C evaluated immediately after semen collection or thawing and after 60min, under dilution of one part semen to four parts extender (1:4).

Acrosome	Fresh semen		Frozen-thawed semen			
			Glycerol addition at 27°C		Glycerol addition at 4°C	
	0'	60'	0'	60'	0'	60'
Normal	98.7 ± 1.5 ^A	98.5 ± 1.6 ^A	94.7 ± 2.2 ^B	96.0 ± 2.6 ^C	97.0 ± 1.0 ^C	97.2 ± 2.0 ^C
Absent	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.6	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0
Swollen	0.6 ± 0.7 ^A	0.2 ± 0.5 ^A	3.4 ± 2.3 ^B	2.2 ± 1.9 ^B	1.8 ± 1.3 ^B	1.8 ± 1.4 ^B
Ruptured	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.6	0.1 ± 0.2	0.5 ± 1.0
Deformed	0.4 ± 0.7	0.5 ± 0.8	1.0 ± 1.1	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.4
Cystic	0.3 ± 0.4	0.7 ± 0.9	0.5 ± 0.7	1.1 ± 1.1	0.6 ± 0.9	0.4 ± 0.3

^{A,B,C} Values followed by different capital letters differ between columns ($P < 0.05$ - Student's t test)

Table 3: Progressive sperm motility (%) of fresh and frozen-thawed canine semen after glycerol addition at 27°C or 4°C in the undiluted (1:0) and diluted one part semen to four parts extender (1:4) samples, kept at 38 °C for 120 min

Evaluations	Fresh semen	Frozen-thawed semen			
		Glycerol addition at 27°C		Glycerol addition at 4°C	
		1:0	1:4	1:0	1:4
0	96.5 ± 3.4 ^{Aa}	65.5 ± 10.9 ^{Ba}	57.5 ± 15.0 ^{Ba}	65.0 ± 8.5 ^{Ba}	61.0 ± 14.1 ^{Ba}
30	85.0 ± 8.8 ^{Ab}	41.5 ± 22.6 ^{Bb}	42.0 ± 18.9 ^{Bb}	45.0 ± 17.16 ^{Bb}	46.0 ± 15.1 ^{Bb}
60	79.0 ± 9.9 ^{Ab}	30.0 ± 14.7 ^{Bc}	30.5 ± 16.3 ^{Bc}	30.0 ± 14.7 ^{Bc}	33.5 ± 15.1 ^{Bc}
90	72.0 ± 9.5 ^{Ac}	9.8 ± 14.5 ^{Bd}	13.8 ± 14.3 ^{Bd}	19.0 ± 16.8 ^{Bd}	21.0 ± 17.6 ^{Bd}
120	68.0 ± 10.6 ^{Ac}	4.5 ± 8.7 ^{Be}	10.3 ± 12.0 ^{Bd}	9.0 ± 11.1 ^{Be}	16.0 ± 16.8 ^{Bd}

^{A,B} Values followed by different capital letters differ between columns ($P < 0.05$ - Student's t test);

^{a,b,c,d,e} Values followed by different lower case letters differ between rows ($P < 0.05$ - Student's t test);

During the thermoresistance test, no differences were observed between the temperatures for glycerol addition and neither among the different post-thaw dilutions ($P > 0.05$) regarding progressive sperm motility (Table 3). A negative effect of incubation time was observed, since that in each evaluation, there was a significant decline in sperm motility in all the groups ($P < 0.05$). In all evaluations, values for fresh semen were always higher than post thawing values for all the groups ($P < 0.05$).

The effect of the dog was significant on all the parameters studied ($P < 0.05$), except on HOST results ($P > 0.05$). However, interactions were only observed between dog and incubation period during thermoresistance test at 90 and 120 min evaluations ($P < 0.05$).

Using glycerol addition at 27°C, there were statistically significant correlations ($P < 0.05$) between immediate post-thaw sperm motility and HOST ($r=75.9\%$) and motility at 60 min ($r=77.5\%$) and at 120 min

($r=42.2\%$). No significant correlations between post-thaw sperm motility and morphologically normal spermatozoa or normal acrosomes were found ($P>0.05$). In the use of 4°C , statistically significant correlations ($P<0.05$) were verified between immediate post-thaw sperm motility and HOST ($r=74.6\%$), motility at 60 min ($r=88.5\%$) and at 120 min (50.6%). There was no significant correlation between post thaw sperm motility and morphologically normal spermatozoa or normal acrosomes ($P>0.05$).

Discussion

Despite its protective effects, glycerol might induce changes in lipid packing structure of the sperm membrane and hence the stability and water permeability of the cell would be altered. Such changes can contribute to reduce sperm longevity and accelerate its capacitation (Watson, 1995). The possibility of reducing these toxic effects by lowering the temperature was reported for ram semen, since the membrane intactness was higher and the proportion of acrosome-reacted spermatozoa was lower when glycerol was added at 5°C instead of 15°C (Gil et al., 2003). On the other hand, Vidament et al. (2000) showed that stallion sperm motility and fertility are improved when glycerol is added at 22°C instead of 4°C .

For canine species, this is the first report to compare room temperature (27°C) and 4°C for glycerol addition, and no differences between them were observed regarding post-thaw sperm motility, morphology, acrosomal integrity, membrane functionality or longevity. These results agree with those found by Peña et al. (1998), who reported no differences on post-thaw sperm motility, live spermatozoa percentage and acrosomal integrity after glycerol addition at 37°C or 4° . Our results also showed that it is unnecessary to keep the semen samples and the extender in water bath at 37°C prior to freezing procedure. Moreover, a cooling time before glycerol addition is not necessary, suggesting that a glycerol-added extender could be combined with canine semen at room temperature in a one-step method. These results disagree from those reported by Okano et al. (2004), who suggested that sufficient time for cooling before glycerol addition may be essential for the preservation of sperm quality after freezing/thawing procedure.

It has previously been shown that canine spermatozoa tolerate exposure to hypertonic solutions of permeating cryoprotectants, especially glycerol (Songsassen et al., 2002), which could be one hypothetic explanation for canine spermatozoa to be low sensitive to different temperatures for glycerol addition. Furthermore, the constitution of plasmatic membrane gives to canine sperm cell an inherent resistance to thermal stress since it has a low ratio of polyunsaturated : saturated phospholipid fatty acids (Bouchard et al., 1990).

Sperm motility remains as the main parameter used to evaluate cryopreservation techniques. In our study, 65% progressive motile spermatozoa were found immediately after thaw with both treatments. This value is within the range currently reported for frozen-thawed canine semen (Peña and Linde-Forsberg, 2000; Silva et al., 2003). However, Rota et al. (2005) reported that the subjective evaluation of immediate post-thaw motility alone might not be a sensitive enough parameter to pick differences that can be better evaluated by other methods.

Oettlé (1993) reported that normal sperm morphology would be better correlated with *in vivo* fertility than sperm motility, since a decrease in fertility would be observed should semen samples with less than 60% normal spermatozoa be used for inseminations. The present study showed a reduction in normal sperm morphology after

freeze-thaw at both treatments. The freeze-thaw process inducing a high incidence of tail and acrosomal defects may explain it. Despite of this, morphological abnormalities are not higher than 20% and thawed semen could still be used for artificial insemination. In addition, post-thaw acrosomal integrity may also be a useful indicator of semen quality (Ferguson et al., 1989). In our study, the decline in acrosomal integrity after thawing was less than 5%.

Concerning to HOST, 33.5% and 39.6% reacted spermatozoa were found after thawing for glycerol addition at 27° or 4°C , respectively, in the use of a 150mOsm solution. Better results (56%) for canine thawed semen were reported by Kumi-Diaka (1993) that tested different hyposmotic solutions and found that 60mOsm/L solution promoted a maximal number or reacted spermatozoa. In our study, it was also observed a decrease in percentage of reacted spermatozoa after thawing when comparing to fresh semen. Kumi-Diaka (1993) suggested that freezing procedure could disrupt sperm cytoplasmic membrane, leading to loss of intracellular solute and decreasing the percentage of reacted spermatozoa. Significant correlations (75%) were verified between HOST and immediate post-thaw sperm motility in our study. Similar correlations were reported by Rota et al. (2005) for canine thawed semen, but a relationship between HOST response and fertilizing capacity of dog spermatozoa has not yet been established (Peña-Martinez, 2004), as reported for humans (Jeyedran et al., 1992).

This study showed that there is no need to extend canine semen after thawing for the thermoresistance test. These results disagree with those reported by Peña and Linde-Forsberg (2000) who suggested that a 1:4 post thawing dilution could improve canine sperm longevity. However, these authors incorporated Equex (Nova Chemical Sales Inc., Siquate, MA, USA) to the extender, which was previously reported to increase longevity of canine spermatozoa (Rota et al., 1997). Anyway, our results demonstrate that the post-thawing dilution provokes no damage to spermatozoa and canine semen could be normally extended to increase the inseminating volume. Furthermore, the present study found 30% progressive motile sperm after one hour at 38°C after thaw and this value was correlated with immediate post-thaw sperm motility. However, the existence of a correlation between post-thawing sperm longevity and *in vivo* fertility rate needs to be confirmed for the dog.

Excepting results from HOST, all parameters were affected by the dog factor, indicating that different dogs may have different sensitivities to the freezing procedure, as previously reported by Rota et al. (2005).

In conclusion, glycerol could be added to canine semen at room temperature (27°C) or at 4°C . Moreover, there is no need to extend canine semen after thawing for the thermoresistance test, but if it is necessary to increase the inseminating volume for artificial inseminations, the addition of extender will not damage the semen.

Acknowledgments

The authors thank Capes by grants and CNPq for financial support, and DVM Daniel C. Uchoa (Grande Canafistula Kennel) for providing the animals used in the experiment.

References

- Bouchard GF, Morris JK, Sikes JD, Youngquist RS, 1990: Effect of storage temperature, cooling rates and two

- different semen extenders on canine spermatozoa motility, *Theriogenology* 34, 147-157.
- England GCW, Plummer JM, 1993: Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47, 261-270.
- Ferguson JM, Renton JP, Farstad W, Douglas TA, 1989: Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39, 293-298.
- Foote R, 1982: Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present and future. *J. Androl.* 3, 85-100.
- Gil J, Lundeheim N, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H, 2003: Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59, 1241-1255.
- Jeyedran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD, 1992: The hypoosmotic swelling test: An update. *Arch. Androl.* 29, 105-116.
- Kumi-Diaka J, 1993: Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39, 1279-1289.
- Nothling JO, Shuttleworth R, 2005: The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology* 63, 1469-1480.
- Oetlé EE, 1993: Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil.* 47, 257-260.
- Okano T, Murase T, Asano M, Tsubota T, 2004. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 1359-1364.
- Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradón PG, 1998: Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology* 50, 163-174.
- Peña A, Linde-Forsberg C, 2000: Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54, 703-718.
- Peña-Martinez, A.I. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 209-224.
- Polge C, Smith AU, Parkers AS, 1949: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 164, 166.
- Rodrigues BA, 1997: Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado. MSc Thesis - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.
- Rota A, 1998: Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. Doctoral Thesis – Swedish University of Agricultural Sciences, Upsala.
- Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H, 1997: Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 47, 1093-1101.
- Rota A, Rota A, Martine M, Milani C, Romagnoli S, 2005: Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 29-37.
- SAS Institute Inc., 1998: Statview Version 5.0: Statview Reference. Cary: SAS Institute Inc.
- Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM, 2002: Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The Vet. J.* 164, 244-246.
- Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM, 2003: Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59, 821-829.
- Songsassen N, Yu I, Murton S, Paccamonti DL, Eilts BE, Godke RA, Leito SP, 2002: Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology* 44, 79-90.
- Strom B, Rota A, Linde-Forsberg C, 1997: In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48, 247-256.
- Vidament M, Ecot P, Noue P, Bourgeois G, Magistrini M, Palmer E, 2000: Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw sperm motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54, 907-919.
- Watson PF, 1995: Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil Dev.* 7, 871-891.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T, 2000: Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54, 579-585.

Submitted: 19.05.2005

Author's address (for correspondence): Alexandre R. Silva, Rua Aracati, 69, Benfica, 60020-240, Fortaleza - Ceará, Brazil. E-mail: legio2000@yahoo.com

8. CAPÍTULO 03

**Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters
on *in vitro* sperm-oocyte interactions**

**Valor preditivo dos parâmetros do sêmen canino congelado-descongelado sobre
as interações espermatozóides-oócitos *in vitro***

Theriogenology

Ref: THERIO-D-05-0034

Aceito para publicação em 19 de dezembro de 2005

RESUMO

A combinação dos dados obtidos a partir da análise convencional de sêmen com os resultados de testes de penetração oocitária poderia melhorar a avaliação da habilidade fertilizante de uma amostra de sêmen. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o valor preditivo de diferentes parâmetros seminais sobre as interações in-vitro entre o sêmen canino congelado/descongelado e oócitos homólogos. Dez ejaculados oriundos de cinco cães foram coletados por manipulação digital. As amostras de sêmen foram avaliadas, diluídas em Tris-gema-glicerol, congeladas e estocadas em nitrogênio líquido, e descongeladas após algumas semanas. As amostras foram então avaliadas quanto aos padrões de motilidade e populações espermáticas pela análise computadorizada (CASA), quanto à integridade da membrana plasmática pela coloração de diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio, e quanto à morfologia espermática pela coloração de Rosa de Bengala. O sêmen descongelado foi também incubado com oócitos homólogos por 18 h em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar a 38°C e as interações espermatozóides-oócitos foram avaliadas. Um modelo de regressão linear simples foi aplicado para obter as relações entre as interações espermatozóides-oócitos e os parâmetros seminais. Relações significativas foram verificadas entre: porcentagem de oócitos ligados a espermatozóides e frequência de batimento de cauda - BCF ($R^2=63\%$), porcentagem de oócitos interagidos com espermatozóides e BCF ($R^2=73\%$); número de espermatozóides penetrados e velocidade média na trajetória - VAP ($R^2=64\%$) e velocidade linear - VSL ($R^2=64\%$). As análises de integridade de membrana plasmática e morfologia espermática apresentaram baixo valor preditivo para as interações in vitro entre espermatozóides caninos congelados/descongelados e oócitos homólogos. Por outro lado, alguns padrões da motilidade espermática avaliados pela CASA apresentaram valor preditivo para as interações espermatozóides-oócitos in vitro na espécie canina.

Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters
on in vitro sperm-oocyte interactions

Alexandre R. Silva^{a*}, Rita de Cássia S. Cardoso^a, Lúcia D. M. Silva^a, Viviane H. Chirinéa^b, Maria D. Lopes^b, Fabiana F. Souza^c

^aLaboratory of Carnivore Reproduction – FAVET, UECE, Paranjana Ave. 1700, Itaperi, 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil

^bLaboratory of Reproduction of Small and Wild Animals – Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, FMVZ, UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^cLaboratory of Animal Reproduction - UNIRP, Rod. BR 153, Km 69, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

Running Title: Prognostic values of canine semen parameters

Abstract

Combining the data from conventional semen analysis with oocyte penetration assays should improve the assessment of the fertilizing ability of a semen sample. Thus, the objective of the present study was to evaluate the prognostic value of various semen parameters on the in vitro interactions between frozen-thawed canine sperm and homologous oocytes. Ten ejaculates from five stud dogs (2 ejaculates/dog) were collected by digital manipulation. Semen samples were evaluated, extended in Tris-egg yolk-glycerol, frozen and stored in liquid nitrogen, and thawed several weeks later. Samples were evaluated for motility and sperm populations by computer-aided semen analysis (CASA), plasma membrane integrity (carboxy-fluorescein diacetate and propidium iodide), and sperm morphology (Bengal Rose). Thawed spermatozoa were also incubated with homologous oocytes for 18 h in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 38 °C and sperm-oocyte interactions were evaluated. Simple linear regression models were calculated with sperm parameters as independent variables and sperm-oocyte interactions as the dependent variable. There were significant associations between: percentage of oocytes bound to spermatozoa and beat cross frequency (BCF; R²=63%); percentage of oocytes that interacted with spermatozoa and BCF (R²=73%); and number of penetrated spermatozoa and velocity average pathway (VAP; R²=64%) and velocity straight line (VSL; R²=64%). Although plasma membrane integrity and sperm

* Corresponding author: Rua Aracati 69, Benfica, 60020-240, Fortaleza – Ceará, Brazil.

morphology had little prognostic value for in vitro interactions between canine frozen-thawed sperm and homologous oocytes, some motility patterns (evaluated by CASA) were predictive of in vitro sperm-oocyte interactions.

Keywords: Dog; Semen; Freezing; Oocyte; CASA

1. Introduction

Cryopreservation induces a series of osmotic, chemical, and mechanical stresses to sperm, causing death of some sperm and severe post-thaw damage in surviving cells, reducing fertilizing ability [1]. Thus, frozen-thawed sperm should be evaluated to assess cell integrity [2].

The ultimate goal of frozen semen evaluation is to predict the fertility of a sample when inseminated into a bitch of normal fertility [3]. Historically, researchers analyzed semen samples by subjectively assessing sperm motility and morphology [4,5]. More recently, evaluations have included the integrity of the plasma membrane [6] and computer-aided semen analysis (CASA) [7]. The development of tests that assess the functional status of sperm cells, such as the sperm-oocyte interaction test [8], have greatly improved semen analysis. Therefore, combining conventional semen analysis with the results of oocyte penetration assays should provide a reliable method to assess the fertilizing ability of semen samples [9], as recently reported for humans [10] and cattle [11]. Since these tests are currently not used in dogs, there is a lack of information concerning associations between standard tests of semen quality and the sperm-oocyte interaction test in dogs.

The aim of the present study was to evaluate the prognostic value of semen measurements e.g. sperm motility patterns and sperm populations identified by CASA, plasma membrane integrity, and sperm morphology, on the in vitro interaction between frozen-thawed canine sperm and homologous oocytes.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Five privately-owned, proven stud dogs (one Brazilian Mastiff and four Boxers) were selected for this experiment. The dogs, aged from 1 to 6 y, were maintained in individual pens and fed dry food once daily, with free access to water.

2.2. Semen collection and initial evaluation

Semen was collected by manual stimulation twice from each dog and the sperm-rich fraction was analyzed. Semen volume and color were grossly evaluated and sperm concentration was determined using a Neubauer counting chamber. Sperm motility was evaluated by light microscopy under 100 x magnification. Sperm cell morphology was evaluated as cited below for frozen-thawed semen.

2.3. Semen processing

An extender consisting of 3.028 g Tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1.78 g monohydrated citric acid and 1.25 g D-fructose, dissolved in 100 mL of distilled water, was used [12]. The osmosis of this solution was 295 mOsm/L and the pH 6.6. Twenty percent (vol:vol) of this solution was subsequently replaced by egg-yolk.

Semen was initially extended in Tris-egg yolk at room temperature (27 °C). Samples were kept in an insulated box for 40 min, with an objective to reach 15 °C, at a cooling rate of -0.30 °C/min, and transferred to a refrigerator for a further 30 min, where it reached 4 °C at -0.37 °C/min rate. After cooling, semen was added (1:1) to Tris-egg yolk plus 12% glycerol also at 4 °C, resulting in a final concentration of 6% glycerol in the extender. Final dilution resulted in a sperm concentration of 200×10^6 sperm/mL. Samples were packed into 0.25 mL plastic straws, which were placed horizontally in an insulated box for 5 min, 5 cm above the liquid nitrogen (N₂) level, reaching a temperature of approximately -70 °C in the vapor. Finally, the straws were plunged into liquid N₂ for storage [13]. After 15 d, samples were transferred to a dry-shipper and transported to another laboratory for further analyses. Immediately before evaluations, samples were thawed for 1 min in a water bath at 38 °C.

2.4. Computer aided semen analysis (CASA)

The CASA was conducted according to Iguer-Ouada and Verstegen [14]. After thawing, semen samples (10 µL) were placed in a Makler chamber, allowed to settle for 1 min, maintained at 38 °C, and examined by a phase-contrast microscopy system with stroboscopic illumination, which was a compound of the Hamilton-Thorne Computer-Aided Semen Analyzer, Version 10 Ivos (HTR-IVOS 10 Analyzer; Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA). Three different, non-consecutive, randomly selected microscopic fields were scanned. The data were computerized and mean \pm SD determined.

The following parameters were measured for each sample: the number of counted cells; the percentage of total motile sperm; the percentage of progressive motile sperm; velocity average pathway (VAP) - the average velocity of smoothed cell path ($\mu\text{m}/\text{sec}$); the velocity straight line (VSL) - the average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of track ($\mu\text{m}/\text{sec}$); the curvilinear velocity (VCL) – the average velocity measured over the actual point-to-point track followed by the cell ($\mu\text{m}/\text{sec}$); the amplitude lateral head (ALH) – amplitude of lateral head displacement (μm); the beat cross frequency (BCF) – frequency of sperm head crossing the sperm average path (Hertz); the straightness (STR) – the average value of the ratio VSL/VAP in percentage (straightness estimates the proximity of the cell path to a straight line, with 100% corresponding to the optimal straightness); and the linearity (LIN) – the average value of the ratio VSL/VCL in percentage (linearity estimates the proximity of the cell track to a straight line). According to low VAP cut-off (LVV) and medium VAP cut-off (MVV), the overall sperm population was subdivided in four categories: Rapid, with $\text{VAP} > \text{MVV}$; Medium, with $(\text{LVV} < \text{VAP} < \text{MVV})$; Slow, with $\text{VAP} < \text{LVV}$; and Static, the proportion of cells that were not moving.

2.5. Plasma membrane integrity

Plasma membrane integrity was assessed with a fluorescent solution containing the fluorophores 6-carboxy-fluorescein diacetate (C-FDA) and propidium iodide (PI), as described by Cunha et al. [6]. An aliquot (10 μL) of thawed semen was extended in 40 μL fluorescent solution. After 10 min, slides of the stained samples were evaluated by epifluorescence microscopy (LEICA – Episcopic Fluorescent Attachment “EFA” Halogen Lamp Set, Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, USA). For each sample stained with C-FDA/PI, 200 sperm were counted and classified as having or lacking an intact plasmalemma, according to the color; sperm stained green (C-FDA) were considered to have an intact plasmalemma, whereas those stained red (PI) or partially stained red, were considered non-intact.

2.6. Sperm-oocyte interactions

2.6.1. Collection and selection of oocytes

Reproductive tracts from bitches of unknown age or cycle stage were collected after ovariohysterectomy ($n = 22$) and transported to the laboratory in warm saline solution ($38\text{ }^\circ\text{C}$) within 2 h after surgery. Ovaries ($n = 44$) were dissected from the tracts in sterile saline plus gentamycin (0.025 mg/mL), washed and placed in sterile 35 mm-grid dishes with 10 mL Phosphate Buffered Saline (PBS), containing 0.4% w/v bovine serum albumin (BSA). Ovaries were finely sliced with a scalpel (#22 blade) to release oocytes from the ovarian cortex. After removal of debris,

the dish was analyzed by stereo-microscopy in order to identify Grade-1 oocytes, containing an even dark ooplasm surrounded by a well-formed, multilayered cumulus cell mass. Selected oocytes were washed five times in PBS and transferred to 95 μ L droplets (10 ova/droplet) of Tyrode's Albumin Lactate-Piruvate – TALP [15] containing 0.3% w/v BSA. Droplets were overlaid with mineral oil equilibrated with sterile saline, and maintained at 38 °C for 30 min under humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air before co-incubation with sperm [8].

2.6.2. Sperm-oocyte co-incubation

After thawing and sperm evaluation, sperm samples were washed by extending them in Sperm-TALP (1:1) [15] and centrifuged (700 x g for 5 min) at room temperature. After washing, the supernatant was discarded and the concentration of sperm pellet was adjusted at 40×10^6 motile cells/mL by dilution in Sperm-TALP. Next, 5 μ L of the sperm cell suspension was added to the oocytes in each droplet of TALP to create a final volume of 100 μ L, with a concentration of 2×10^6 motile sperm/mL. A minimum of 30 oocytes (three droplets) was used per replicate. After incubation for 18 h at 38 °C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air, the oocytes were removed, washed in PBS plus BSA, and transferred to a tube containing 1% aqueous sodium citrate for 10 min to expand the cumulus cells. Samples were then vortexed for 3 min to detach cumulus cells. Finally, oocytes were incubated for 20 min in Hoechst 33258 in 2.3% sodium citrate (100 μ L/mL) to stain bound and penetrated sperm heads. Stained oocytes were placed on a clean slide and sandwiched with a coverslip, supported by silicon, to prevent damage to the oocytes [8]. These oocytes were examined at 400 x under fluorescent illumination (LEICA – Episcopic Fluorescent Attachment “EFA” Halogen Lamp Set; Leica Microsystems Inc.) to identify the percentage of oocytes bound to sperm, oocytes with sperm penetrated into the perivitelline space or ooplasm, and the number of sperm that had bound and penetrated the oocytes. From these data, the percentage of oocytes interacting with sperm was calculated, representing the total percentage of all forms of interaction between oocytes and sperm, such as only bound, only penetrated, or bound plus penetrated oocytes. Similarly, the number of sperm interacting with oocytes was also calculated, i.e. the number of sperm only bound, only penetrated, or bound plus penetrated.

2.7. Sperm morphology

Sperm morphology was evaluated by phase-contrast microscopic (1000 x) examination of a slide stained with Bengal Rose (total of 200 sperm/slide). Sperm morphologic abnormalities were classified as primary and secondary [12,13].

2.8. Statistical analysis

Ten replicates were used. The results were expressed as means (\pm SD) and analyzed by Statview 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A simple linear regression model was used to identify associations between sperm-oocyte interactions (dependent variables) and sperm parameters (independent variables). Probabilities < 0.05 were considered significant. The existence of an individual effect of a dog on all parameters studied was determined by analysis of variance, followed by Fisher's PLSD test ($P < 0.05$).

3. Results

Fresh dog semen was milky-white in color. The mean (\pm SD) volume of the sperm-rich fraction was 0.9 ± 0.4 mL, with a concentration of $1030.3 \pm 600.2 \times 10^6$ sperm/mL. Sperm motility (subjective assessment of fresh semen) was $97.5 \pm 3.5\%$ and $92.5 \pm 3.4\%$ of sperm had normal morphology.

Sperm motility patterns (CASA data) of the frozen-thawed semen are shown in Table 1. The proportion of sperm in the four populations were as follows: rapid, $63.9 \pm 9.4\%$; medium, $4.3 \pm 1.2\%$; slow, $26.4 \pm 7.2\%$; and static, $5.6 \pm 2.5\%$. Using epifluorescence microscopy of frozen-thawed semen, 39.4 ± 11.7 and $60.6 \pm 11.7\%$ of sperm had intact and non-intact sperm membranes, respectively.

Table 1: Sperm motility patterns observed in canine frozen/thawed semen (n=10) by Computer Aided Semen Analysis (CASA).

Sperm motility patterns	Mean \pm SD
No. sperm evaluated	1209.2 \pm 235.1
Total motile sperm (%)	68.7 \pm 9.3
Progressively motile (%)	57.3 \pm 8.1
Velocity average pathway (μ m/sec)	100.9 \pm 7.4
Velocity straight line (μ m/sec)	89.0 \pm 7.2
Curvilinear velocity (μ m/sec)	136.8 \pm 9.7
Amplitude lateral head (μ m)	5.2 \pm 0.3
Beat cross frequency (Hz)	22.8 \pm 2.9
Straightness (%)	87.5 \pm 2.2
Linearity (%)	66.3 \pm 3.4

Due to the reduced volume in semen samples, post-thaw sperm morphology was evaluated in only six replicates. There were $87.2 \pm 4.8\%$ normal sperm, with $1.4 \pm 1.6\%$ primary and $11.2 \pm 3.5\%$ secondary abnormal sperm, including: decapitated sperm, $1.4 \pm 1.6\%$; acrosomal defects, $2.1 \pm 1.2\%$; broken midpieces, $1.4 \pm 2.1\%$; and coiled tails, $5.7 \pm 3.9\%$.

For the sperm-oocyte interaction test, 5.5 ± 2.1 ovaries were used for each semen sample tested. The number of oocytes obtained from each ovary ranged from 0 to 222. The total number of oocytes collected to be used in this study was 1346 oocytes; from that number, 322 Grade-1 oocytes were selected for use in this trial. It was noteworthy that 30 Grade-1 oocytes were used for each frozen-thawed semen sample. Results of sperm-oocyte interactions are expressed in Table 2.

Table 2: Interactions among frozen-thawed canine sperm (n=10 samples) and homologous oocytes after 18 h of incubation.

Sperm-oocyte interactions	Mean \pm SD	Range
Oocytes bound to spermatozoa (%)	57.5 ± 21.0	26.3 - 89.4
Oocytes penetrated by spermatozoa (%)	36.6 ± 14.8	18.8 - 60.0
Oocytes interacted* with spermatozoa (%)	72.7 ± 19.8	36.8 - 100.0
No. bound spermatozoa	1.9 ± 1.1	1 - 9
No. penetrated spermatozoa	1.2 ± 0.3	1 - 3
No. interacted* spermatozoa	2.3 ± 1.4	1 - 11

* Interacted means only bound, only penetrated or bound plus penetrated.

Based on linear regression analyses, there were relationships between: percentage of oocytes bound to sperm and BCF ($R^2=63\%$; $P=0.04$); percentage of oocytes interacting with sperm and BCF ($R^2=73\%$; $P=0.01$); number of penetrated sperm and VAP ($R^2=64\%$; $P=0.04$) and VSL ($R^2=64\%$; $P=0.04$). There were no significant associations ($P>0.05$) among sperm-oocyte interactions and the other motility patterns, sperm populations, plasma membrane integrity, or sperm morphology.

There was an effect of individual dog ($P < 0.05$) for VAP, VCL, STR, LIN, sperm populations, number of bound sperm, and number of sperm interacting with oocytes. Since sperm morphology was not done on some replicates, the dog effect could not be determined for this parameter.

4. Discussion

Although the multiparameter evaluation of semen has been extensively reviewed [2,3,16], it is clear that further studies are needed to identify one or more tests to accurately predict fertility of

cryopreserved semen. It was proposed that CASA could overcome subjectivity in semen analysis; it has been used in several species, including the dog [14]. The HTR-IVOS 10 analyzer yielded measures of various motility patterns that were essential for fertilization in boars [17]. In the present work, total and progressive sperm motility, VAP and VCL values were similar to those found by Peña and Linde-Forsberg [18]. Values for ALH and BCF found in our study seemed high, an indication of sperm hyperactivation [18]. It was noteworthy that a low ALH value was related to failure of in vitro fertilization in human sperm [19].

BCF had significant associations to bound and interacted oocytes rates in the present study, suggesting that a hyperactive motion pattern is needed for initial stages of in vitro fertilization, as previously reported by Verstegen et al. [20]. Sperm velocity patterns of VAP and VSL were significantly related to the number of penetrated sperm. VAP is known as a significant predictor of in vitro fertility (IVF); its enhancement is an indication of capacitation, which is essential for fertilization [20]. In addition, as VSL indicates sperm forward progression [20], these associations suggested that progressive sperm motion directly affects in vitro sperm-oocyte interactions in the canine.

According to our results, some motility patterns evaluated by CASA were predictive of in vitro sperm-oocyte interactions in dogs. Similarly, Herrera et al. [11] demonstrated that CASA could be used as an efficient predictor for IVF in cattle; in that species, IVF was significantly related to progressive sperm motility after thawing, but not to VAP, LIN and BCF. Furthermore, Donnelly et al. [21] found significant relationships between IVF rates and progressive sperm motility, VAP, VCL and VSL in humans; they inferred that some CASA measurements provided reliable estimation of the fertilizing ability of human sperm. Coefficients of relation (R^2) found in the present study ranged from 63 to 73%; these were within the range reported by other authors, who reported relations between CASA parameters and IVF that ranged from 27% [10] to 85% [11] in various species.

Our findings confirmed that sperm motility in a dog semen sample is not uniform, but rather can be categorized in separate subpopulations [22]. Although significant relationships between rapid sperm population and IVF rates were previously described for humans [10], we did not identify significant relationships among a single sperm subpopulation and sperm-oocyte interactions for dogs. Perhaps in vitro fertilizing ability in dogs is not necessarily associated to a sperm population with rapid motion, but rather is distributed among various sperm populations.

Using the CFDA/PI staining, Rota et al. [23] reported 56% of canine sperm had intact sperm membranes, compared to 39% in the present study. That there was a high incidence of sperm with a non-intact plasma membrane could represent various stages of sperm activation [24]. In fact, capacitation-like changes in dog semen seem to be both initiated and accelerated by cryopreservation procedures [25]. No significant relationship between plasma membrane integrity

and sperm-oocyte interactions in dogs was found in this study; however, it has been reported that both acrosome-intact and acrosome-reacted sperm are capable of binding to the zona pellucida in dogs [26]. In contrast, Hay and Goodrowe [27] reported that acrosomal integrity is a critical factor in determining the fertilizing ability of feline sperm cells. Further studies regarding relationships among sperm-oocyte interactions and various analyses of the functional integrity of sperm should be conducted in dogs.

It is known that fertility in dogs is only adversely affected when the proportion of morphologically normal sperm is $< 60\%$ [28]. In the present study, the cryopreservation procedure used resulted in 87% morphologically normal frozen-thawed sperm. However, since not all damage would be apparent with phase-contrast microscopy, ideally other techniques (e.g. electron microscopy) should be used for sperm analysis. Moreover, no significant relations between sperm morphology and sperm-oocyte interactions were found. These results were consistent with those reported by Tartaglione and Ritta [29] that sperm motility and morphology were not good predictors of in vitro fertility in bulls. However, Jedrzejczak et al [30] observed that normal sperm morphology in human fresh semen was significantly related to IVF and demonstrated that an increase in sperm tail structural defects corresponded to a lower proportion of fertilized oocytes.

In the present study, there was a high rate of interactions among canine frozen-thawed sperm and homologous oocytes (72%). These results were in agreement with a previous report of 70% frozen-thawed sperm-oocyte interactions in canine species [8]. We found 36% penetrated oocytes and 57% with sperm bound to the zona. Similar results were observed by De los Reyes et al [31] who reported a penetration rate of 34% using canine frozen-thawed semen. Our results seemed lower than the 60% penetration rate for fresh canine semen, reported by Hewitt and England [9]. Although both acrosome-intact and acrosome-reacted sperm are capable of binding to the zona pellucida in dogs [26], cryopreservation adversely affects the fertilizing capacity of sperm, mainly due to modifications in the sperm cell membrane [1]. Fertilizing capacity could be interpreted as the ability of sperm to bind to the zona, penetrate the oocyte, and promote embryo development.

Between one and three sperm penetrated the oocytes in this study, indicating the presence of polyspermy, in agreement with previous reports [8,9]. Moreover, we observed from one to 11 sperm bound to the zona (average 1.9 sperm/oocyte), similar to that previously reported in a study of a zona pellucida binding assay in dogs [32].

Although the reproductive status of oocytes-donor bitches used in this study was unknown, Rodrigues et al. [33] showed that viable oocytes could be obtained from bitches at various stages of the reproductive cycle, since dog embryos depend more on the intrinsic development of the oocyte, rather than the reproductive stage of the bitch at the time of oocyte retrieval. Although the oocytes did not undergo any maturation procedure in this study, Hewitt et al. [34] showed that the assay can be performed quickly and easily using either mature or immature oocytes. In contrast, Fontbonne et

al. [35] recently reported that no sperm penetration occurred in vivo in immature canine oocytes. Thus, the relationship between in vitro sperm-oocyte interactions and in vivo fertility in dogs needs further study.

There was a significant effect of the individual dog on some post-thaw seminal parameters, suggesting that individual dogs may have different susceptibility to sperm cryopreservation, as previously reported [15]. In swine, differences among individuals for susceptibility to cryopreservation and in vitro fertility have been reported [17]. Furthermore, individual stallions have been designated as “poor” or “good” regarding the susceptibility of their sperm to cryopreservation [36].

To our knowledge, the present study is the first to evaluate the prognostic value of various parameters of frozen semen on in vitro sperm-oocyte interactions in dogs. Although various tests [2,15,23,25] have been used to evaluate canine frozen semen samples, no significant relationships were reported between the results and in vitro or in vivo fertility. Therefore, it is important to be cautious in estimating the potential fertility of a specific semen sample based exclusively on sperm characteristics.

In conclusion, some motility patterns evaluated by CASA were predictive for the interaction of frozen-thawed canine sperm and homologous oocytes in vitro. However, analysis of plasma membrane integrity and sperm morphology had little prognostic value.

Acknowledgments

The authors thank Capes for grants and CNPq for financial support, and Daniel C. Uchoa DVM (Grande Canafístula Kennel) for providing the animals used in the experiment.

References

- [1] Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:781-891.
- [2] Peña-Martinez I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:209-224.
- [3] Eilts BE. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology* 2005;64:685-691.
- [4] Harrop AE. Some observations on canine semen. *Vet Rec* 1955;25:494-498.
- [5] Heywood R, Sortwell RJ. Semen evaluation in the beagle dog. *J Small Anim Pract* 1971;12:343-346.

- [6] Cunha ICN, Lopes MD, Zuccari CESN. Padronização da técnica fluorescente para a avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. Proc XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias Brasil 1996;1:411(abstract).
- [7] Gunzel-Apel AR, Gunther C, Terhaer P, Bader H. Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. J Reprod Fertil 1993;47:271-278.
- [8] Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL. Canine spermatozoa – cryopreservation and evaluation of gamete interaction. Theriogenology 1997;48:1329-1342.
- [9] Hewit DA, England GCW. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. Anim Reprod Sci 1997;50:123-139.
- [10] Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I. Relationship between sperm motility characteristics assessed by computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. J Assist Reprod Genet 2001;18:213-218.
- [11] Herrera C, Brogliatti G, Cavia R, Conde P, Revora M, Pasqualini RS. CASA sperm parameters and their relation with in vitro fertilization. Proc 15th Int Congress Anim Reprod Brazil, 2005;2:411.
- [12] Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. Vet J 2002;164:244-246.
- [13] Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. Theriogenology 2003;59:821-829.
- [14] Iguer-Ouada M, Verstegen JP. Evaluation of the “Hamilton Thorn Computer-Based Automated System” for dog semen analysis. Theriogenology 2001;55:733-749.
- [15] Silva AR. Cryopreservation of canine semen extended in Tris: Evaluation of morphology, function and interactions to homologue oocytes. Thesis, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil. 2005.
- [16] Rodriguez-Martinez H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. Proc 16^o Cong Brazilian Reprod Anim Brazil 2005;1:1-9.
- [17] Gil MA, Roca J, Cremades T, Hernández M, Vázquez JM, Rodríguez-Martinez H, Martínez EA. Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates? Theriogenology 2005;64:305-16.
- [18] Peña A, Linde-Forsberg C. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. Theriogenology 2000;54:859-875.
- [19] Jeulin C, Feneux D, Serres C, Jouannet P, Guillet-Rosso F, Bellaish-Alart J. et al. Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization. J Reprod Fertil. 1986;76:735-744.
- [20] Verstegen JP, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in adrology research and veterinary practice. Theriogenology 2002;57:149-179.

- [21] Donnelly ET, Lewis SEM, McNally JA, Thompson W. In vitro fertilization and pregnancy rates: The influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril* 1998;70:305-314.
- [22] Amman RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 1993;14:397-406.
- [23] Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 1997;47:1093-1101.
- [24] Colenbrander B, Gadella BM, Stout TAE. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod Dom Anim* 2003;38:305-311.
- [25] Rota A, Peña AI, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlorthetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci* 1999;57:199-215.
- [26] Kawakami E, Vandervoort CA, Mahi-Brown CA, Overstreet JW. Induction of acrosome reaction of canine spermatozoa by homologous zona pellucida. *Biol Reprod* 1993;48:841-845.
- [27] Hay MA, Goodrowe KL. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J Reprod Fertil* 1993;Suppl 47:297-305.
- [28] Oettlé EE. Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil* 1993;47:257-260.
- [29] Tartaglione CM, Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2004;62:1245-1252.
- [30] Jedrzejczak P, Pawelczyk L, Taszarek-Hauke G, Kotwicka M, Warchol W, Kurpisz Z. Predictive value of selected sperm parameters for classical in vitro fertilization procedure of oocyte fertilization. *Andrologia* 2005;72-82.
- [31] De los Reyes M, Carrion M, Barros C. In vitro fertilization of in vitro matured canine oocytes using frozen-thawed dog semen. *Proc 5th Int Symp Canine Feline Reprod Brazil* 2004;1:194-195.
- [32] Strom-Holst B, Larsson B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J Reprod Fertil* 2000;119:201-206.
- [33] Rodrigues BA, Dos Santos LC, Rodrigues JL. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004;67:215-223.
- [34] Hewitt DA, Fletcher S, England GCW. Test of canine sperm function in vitro using primary homologous oocytes with fluorescence and confocal microscopy. *J Reprod Fertil* 2001;57:127-136.
- [35] Fontbonne A, Reynaud K, Marseloo N, Dumasy M, Chastant-Maillard S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Proc 5th Int Symp Canine Feline Reprod Brazil* 2004,1:144-145.

[36] Kirk ES, Squires EL, Graham JK. Comparison of in vitro laboratory analysis with the fertility of cryopreserved stallion sperm. *Theriogenology* 2005; 64:1422-1439.

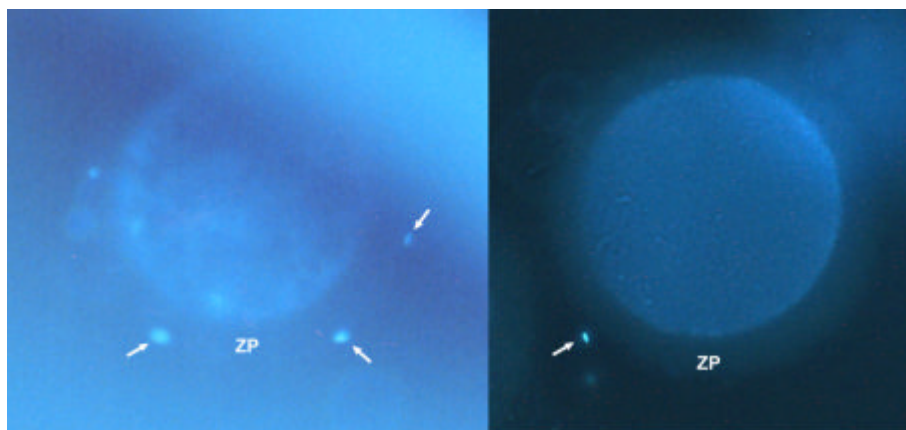
Figuras relacionadas ao Capítulo 03

Figura 1: Oócitos caninos corados em Hoeschst 33258, apresentando espermatozóides (seta branca) ligados à sua zona pelúcida (zp).

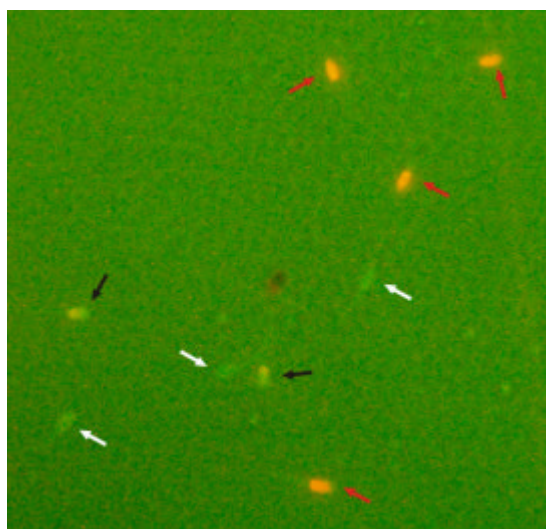


Figura 2: Espermatozóides caninos corados com carboxifluoresceína/iodeto de propídio, apresentando membrana plasmática intacta (corados em verde - seta branca) e não-intacta (corados em vermelho – seta vermelha; ou parcialmente corados – seta preta), visualizados por microscopia de fluorescência.

9. CAPÍTULO 04

Combined evaluation of multiple morphological parameters and fine structural appearance of canine frozen-thawed semen

Avaliação combinada de múltiplos parâmetros morfológicos e aparência ultra-estrutural do sêmen canino congelado -descongelado

RESUMO

Existe uma carência de informações concernentes à avaliação combinada de múltiplos parâmetros morfológicos e da aparência ultra-estrutural do sêmen canino congelado. O presente estudo objetivou descrever e discutir acerca das alterações em alguns parâmetros morfológicos e na aparência ultra-estrutural de espermatozóides caninos provocados por um procedimento padrão de criopreservação. Ejaculados de quarto cães foram coletados por manipulação digital. As amostras de sêmen foram avaliadas, diluídas em Tris-gema-glicerol, congeladas e estocadas em nitrogênio líquido, e posteriormente descongeladas e submetidas à avaliação da motilidade espermática pela análise computadorizada (CASA), morfologia espermática, integridade acrossomal, integridade da membrana plasmática e aparência ultra-estrutural pela da microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As principais alterações morfológicas observadas no sêmen descongelado foram cabeças destacadas, defeitos de acrossoma, peça intermediária curvada, caudas quebradas e enroladas. Houve um declínio na integridade acrossomal após a descongelação. Uma alta proporção de membranas plasmáticas não-intactas foi verificada após a descongelação. No que diz respeito aos resultados de TEM, as alterações mais comumente observadas após a descongelação incluíam plasmalema da cabeça edemaciado e com balonamento, membrana acrossomal externa com ondulações, membrana acrossomal vesiculada e perda de conteúdo acrossomal, bem como plasmalema edemaciado e região bainha mitocondrial de aspecto anormal na região da peça intermediária. Pode-se concluir que a criopreservação induz uma série de alterações morfológicas no espermatozóide canino, mas algumas destas alterações são apenas percebidas através de uma avaliação profunda da aparência ultra-estrutural da célula espermática. Além disso, sugere-se o uso da avaliação combinada de múltiplos parâmetros morfológicos e da aparência ultra-estrutural para a análise do sêmen canino congelado-descongelado.

Combined evaluation of multiple morphological parameters and fine structural appearance of canine frozen-thawed semen

Alexandre R. Silva¹, Rita de Cássia S. Cardoso¹, Lúcia D. M. Silva¹, Viviane H. Chirinéa², Maria D. Lopes²

¹Laboratory of Reproduction of Carnivores – State University of Ceará, Paranjana Ave. 1700, Itaperi, 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil

²Laboratory of Reproduction of Small and Wild Animals – State University of São Paulo, Rubião Junior District, s/n, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Abstract

There is a lack of information concerning combined evaluation of multiple morphological parameters and the fine-structural appearance of canine frozen spermatozoa. The present study aimed to describe and discuss about the alterations in some morphological parameters and fine-structural appearance of the canine spermatozoa provoked by a standardized cryopreservative procedure. Ejaculates from four stud dogs were collected by digital manipulation. Semen samples were evaluated, extended in Tris-egg yolk-glycerol, frozen and stored in liquid nitrogen, and further thawed and submitted to evaluation of progressive sperm motility by computer-aided semen analysis (CASA), sperm morphology, acrosomal integrity, plasma membrane integrity and sperm fine-structural appearance by transmission electronic microscopy (TEM). The main morphological abnormalities observed in frozen semen were detached heads, acrosomal defects, bent midpiece, kinked and coiled tails. There was a decline in acrosomal integrity after thaw. A high rate of non-intact plasma membrane was verified after thaw. Concerning to TEM results, most common post-thaw sperm alterations included swollen and ballooning head plasmalemma, undulant outer acrosomal membrane, vesiculated acrosomal membrane and lost of acrosomal contents, as well as swollen plasmalemma and abnormal mitochondrial sheath in midpiece region. We can conclude that cryopreservation induces a series of morphologic alterations in canine sperm, but some of these alterations can only be realized through a deep analysis of the fine-structural appearance of the sperm cell. Furthermore, we suggest the use of combined evaluation of multiple morphological parameters and fine structural appearance for the canine frozen-thawed semen analysis.

Keywords: Dog, Semen, Freezing, Electronic Microscopy, Sperm Morphology

1. Introduction

Cryopreservation procedures can provoke physical-chemical alterations that lead to rupture of the sperm membrane, removal of important membrane proteins, ionic rearrangement, alterations in the lipid-protein bi-layer and modifications in the membrane enzymes of the sperm cell (Holt, 2000). Frozen spermatozoa should be assessed to determine the degree of cell injury caused by cryopreservation (Peña-Martinez, 2004). Most studies on canine semen cryopreservation are focused mainly on post thaw sperm motility analysis (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997). The combined evaluation of multiple morphological parameters and fine-structural appearance of canine frozen-thawed semen is not currently performed.

Several staining techniques are used for sperm morphology assessment. Among them, Bengal Rose allows us to evaluate not only the morphology, but also the acrosomal integrity of the sperm cell (Rodrigues, 1997). Furthermore, some authors demonstrated the use of fluorescent stains to evaluate plasma membrane integrity in sperm cells (Rota *et al.*, 1997).

The fine-structural analysis involves a thorough morphological evaluation of the sperm cell contents (Rodriguez-Martinez and Enkwall, 1989). Transmission electronic microscopy (TEM) was reported as an efficient method for the evaluation of the sperm fine structure (England and Plummer, 1993; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1993). However, TEM is not currently used for canines, which results in a lack of studies regarding the fine-structural appearance of canine spermatozoa before and after cryopreservation.

The objective of the present study was to describe and discuss the alterations in some morphological parameters, such as sperm morphology, acrosomal status, plasma membrane integrity and fine-structural appearance of the canine spermatozoa caused by a standardized cryopreservation procedure.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Four proven stud dogs of different breeds, one Brazilian Mastiff and three Boxers, from a private kennel were selected for this experiment. The dogs were aged from one to six years. The animals were maintained in individual boxes and fed dry food once daily, with free access to water.

2.2 Semen collection and initial evaluation

Each dog was submitted to one semen collection by manual stimulation, and the sperm-rich fraction was evaluated. Semen volume and color were grossly evaluated. Sperm motility was analyzed by light microscopy (100x). Sperm concentration was determined using a Neubauer

counting chamber. Sperm morphology, acrosomal status and fine-structural appearance were evaluated as described below.

2.3 Semen cryopreservation

An extender consisting of 3.028g Tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1.78g monohydrated citric acid and 1.25g D-fructose, dissolved in 100mL distilled water (Silva *et al.*, 2002) was used. The osmosis of this solution was 295mOsm/L and the pH 6.6. Twenty percent of this solution was then replaced by egg-yolk (vol:vol).

Cryopreservation procedure adopted was that reported by Silva *et al.* (2003). During initial analysis, semen remained at room temperature (27°C) for 10 min and further extended in Tris-egg yolk. Semen was kept in a thermal box for 40 min aiming to reach 15°C, at a cooling rate of -0.30°C/min. Samples were then transferred to a refrigerator for a further 30 min, where they reached 4°C at -0.37°C/min rate. After cooling, semen was added to Tris-egg yolk plus 12% glycerol also at 4°C, which provided a final concentration of 6% glycerol in the extender. Final sperm concentration was 200×10^6 spermatozoa/mL. Samples were packed into 0.25mL plastic straws, which were placed horizontally in a thermal box for 5 min, 5cm above the liquid nitrogen (N₂) level, reaching a temperature close to -70°C in the vapor. Finally, straws were plunged into liquid N₂ for storage. After 15 days, samples were transferred to a dry-shipper and transported to another laboratory for further analyses. Immediately before evaluations, samples were thawed in a water bath at 38°C/1 min. Progressive sperm motility was assessed by a computer-aided semen analysis (CASA - Hamilton Thorn Analyzer Ivos 10, Hamilton Thorne Research, Beverly, USA), which also measured two sperm morphological parameters: elongation and area.

2.4 Sperm morphology and acrosomal integrity

After semen collection and thaw, sperm morphology was evaluated by phase-contrast microscopy, under 1000x magnification, analyzing a slide stained with Bengal Rose (Rodrigues, 1997), counting 200 cells per slide. Sperm morphologic alterations were classified according to their origin as primary and secondary (Seager, 1986), and according to the sperm region affected as head, midpiece or tail defects (Silva *et al.*, 2003). Acrosomal integrity was also evaluated, and acrosomal defects were classified as absent, swollen, detached, cystic and abnormal distributed (Rodrigues, 1997).

2.5 Sperm fine structure

After collection and thawing, semen aliquots from only three dogs were individually centrifuged at 720G / 5 min. Pellets were fixed using 3% glutaraldehyde in phosphate buffer and kept at 5°C prior to the procedure. For transmission electronic microscopy, fixed samples were

pooled, post-fixed in phosphate buffer plus osmium tetroxide (1%), dehydrated by acetone solutions and embedded in Araldite. Ultra fine sections (50nm) were obtained and stained with uranyl acetate and lead citrate before examination by a transmission electronic microscope (Philips CM 100, Germany). Spermatozoa were documented by micrographs and results were subjectively described (Chirinéa, 2004).

2.6 Plasma membrane integrity

Plasma membrane integrity was assessed with a fluorescent solution containing fluorophores 6-carboxy-fluorescein diacetate (C-FDA) and propidium iodide (PI), as described by Rota *et al.* [6]. One aliquot of 10 μ L thawed semen was extended in 40 μ L fluorescent solution. After ten minutes, slides of the stained samples were evaluated by epifluorescence microscopy (LEICA – Episcopic Fluorescent Attachment “EFA” Halogen Lamp Set, Sweden). For each sample stained with C-FDA/PI, 200 sperm cells were counted and classified as having or not an intact plasmalemma, according to the color. Cell membranes stained in green (C-FDA) were considered intact, while those stained in red (PI) or partially stained were considered as non-intact.

2.7 Statistical analysis

Four replicates were used in this experiment, except for TEM that used three replicates. Data were expressed as mean and standard deviation and analyzed by the Statview 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, USA). Differences regarding plasma membrane integrity, sperm morphology and acrosomal status, were verified by Mann-Whiney test ($P < 0.05$).

3. Results

Fresh dog semen was white-milky in color. The volume of sperm rich fraction was 1.01 ± 0.15 mL, with a sperm concentration of $777.67 \pm 266.70 \times 10^6$ spermatozoa/mL. Sperm motility of fresh semen was 96.2 ± 4.8 % spermatozoa. After thaw, it was verified $60.0 \pm .3$ % motile spermatozoa by CASA, which also showed values of 64.0 ± 0.82 % and 3.05 ± 0.10 μm^2 for elongation and area, respectively.

Evaluation of the sperm morphology according to the sperm region affected is shown in Table 01. There was a significant higher incidence of coiled tails and acrosomal defects in frozen semen, but no differences regarding normal sperms were observed. Concerning the origin of the alteration, 0.89 ± 0.77 % and 1.55 ± 1.76 % primary alterations were observed in fresh and frozen semen, respectively. Regarding the secondary alterations, a 6.0 ± 3.88 % and 11.12 ± 4.46 % incidence was found in fresh and frozen semen, respectively. There were no differences between fresh and frozen semen regarding the origin of the morphologic alterations. Furthermore, the

acrosomal integrity is presented in Table 02. A decrease in the percentage of spermatozoa with normal acrosome was observed after thawing.

Table 01: Sperm morphology analysis in fresh and frozen canine semen

Sperm morphology	Fresh Semen	Frozen Semen
Normal sperm (%)	93.21 ± 3.48	87.08 ± 5.88
Head alterations (%)		
Detached head	3.10 ± 03.53	1.67 ± 1.87
Macrocephalic	0.0 ± 0.0	0.13 ± 0.26
Abnormal morphology	0.37 ± 0.45	1.42 ± 1.88
Acrosomal defect	0.79 ± 0.61 ^a	2.30 ± 0.90 ^b
Midpiece alterations (%)		
Thickened midpiece	0.28 ± 0.57	0.13 ± 0.26
Bent midpiece	0.74 ± 0.97	1.38 ± 2.75
Abaxial insertion	0.14 ± 0.28	0.25 ± 0.50
Tail alterations (%)		
Kinked tail	0.25 ± 0.49	1.17 ± 2.01
Coiled tail	0.86 ± 0.84 ^a	4.23 ± 1.73 ^b
Double tail	0.38 ± 0.26	0.0 ± 0.0

Values followed by different letters differs between columns (P<0.05).

Table 02: Acrosomal integrity on canine fresh and frozen semen.

Acrosomal Status (%)	Fresh Semen	Frozen Semen
Normal	99.17 ± 0.64 ^a	97.14 ± 1.04 ^b
Absent	0.14 ± 0.28	0.28 ± 0.33
Swollen	0.0 ± 0.0	1.69 ± 1.48
Cystic	0.40 ± 0.27	0.90 ± 1.10
Abnormal distribution	0.15 ± 0.30	0.0 ± 0.0
Detached	0.15 ± 0.30	0.0 ± 0.0

Values followed by different letters differs between columns (P<0.05).

For plasma membrane integrity, 46.75 ± 13.15% intact and 53.25 ± 13.15% non-intact sperm membrane were observed in frozen semen. No differences were observed among intact and non-intact membrane sperms.

Concerning the fine structure of canine semen, several fresh spermatozoa showed a slightly swollen but intact plasmalemma above the acrosomal region (Fig. 01A). The most common

alterations observed in the head region of frozen canine spermatozoa (Fig. 01B-D) included swollen and ballooning plasmalemma, undulating outer acrosomal membrane, vesiculation of the acrosomal membrane and loss of electro-dense acrosomal contents. The midpiece region was intact in fresh spermatozoa (Fig. 02A), but some cells presented swollen plasmalemma in this region (Fig. 02B). Regarding to frozen-thawed semen, the midpiece region presented the plasmalemma usually swollen and the mitochondrial sheath unorganized, although the axoneme seemed to remain intact (Fig. 02C-D).

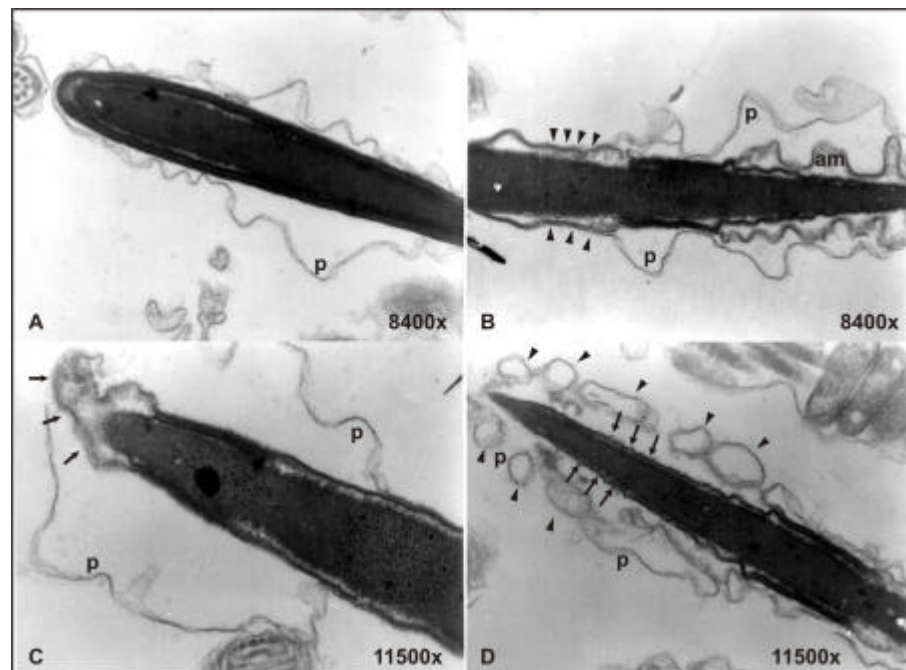


Figure 1: Fine-structural appearance of the head region of: A - slightly swollen plasmalemma (p) above the acrosomal region in a fresh canine spermatozoon; and the most common alterations observed in the head region of frozen canine spermatozoa: B – swollen plasmalemma (p) and undulant outer acrosomal membrane (am) and areas of vesiculation (arrow heads) in the acrosomal membrane; C - swollen plasmalemma (p) and loss of electro-dense acrosomal contents (arrows), 11500x; D – swollen (p) and ballooning (arrow heads) plasmalemma and vesiculation (arrows) in the acrosomal membranes.

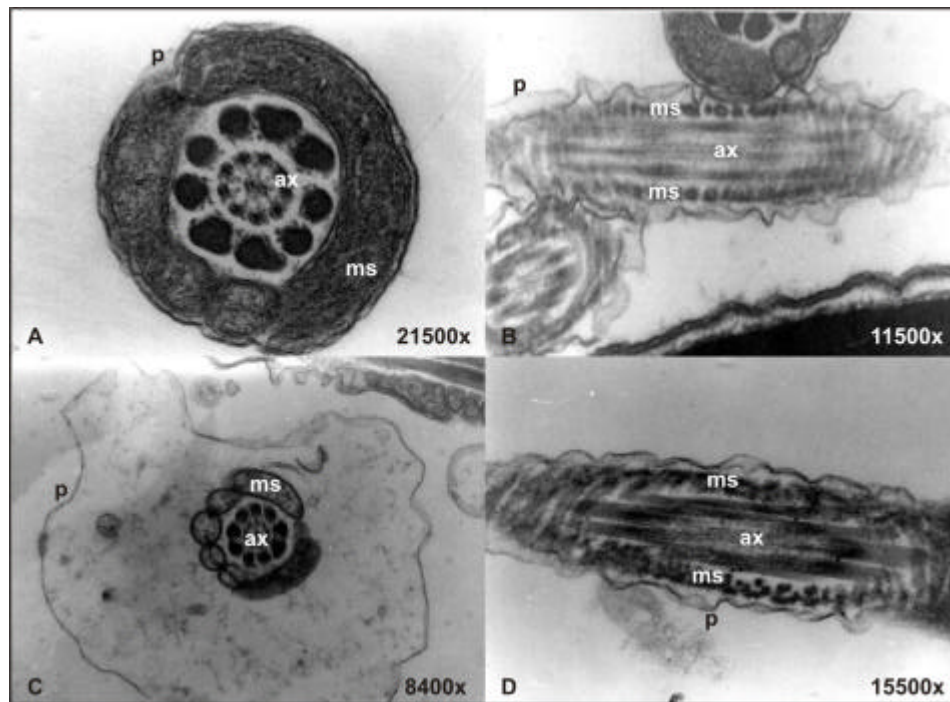


Figure 2: Transmission electron micrographs of the midpiece region in canine spermatozoa showing: A - longitudinal section illustrating intact plasmalemma (p), mitochondrial sheath (ms) and axoneme (ax) in fresh semen; B - sagittal section illustrating swollen plasmalemma (p) and normal mitochondrial sheath (ms) and axoneme (ax) in fresh semen; C- longitudinal section, and D -sagittal section demonstrating swollen plasmalemma (p) and abnormal appearance of mitochondrial sheath (am), but intact axoneme (ax), in frozen-thawed semen.

4. Discussion

Fertility in dogs is only adversely affected when the rate of morphologically normal spermatozoa falls below 60% (Oettlé, 1993). The cryopreservation procedure adopted in the present study was able to maintain more than 85% normal sperms after thawing. The main morphological abnormalities observed in frozen semen were secondary defects (Seager, 1986), probably originated from the thermal shock and osmotic stress caused by the freezing-thawing procedures (Farstad, 1996). It is known that the addition or removal of the cryoprotectant causes a transient osmotic stress that affects the sperm plasmalemma (Gao *et al.*, 1993), which could lead to the membrane fragility and cause sperm tail detachment (Silva *et al.*, 2003).

Post-thaw acrosomal integrity may also be a useful indicator of semen quality (Ferguson *et al.*, 1989). In the present study, sperm morphology evaluation showed an increase of acrosomal defects after thawing, represented mainly by swollen spermatozoa. In bovine sperm, post-thaw acrosomal defects seem to be caused by the activation of proteases, as their previous inhibition was

providing a protective effect on sperm membranes (Sanchez *et al.*, 1995). Decline in post-thaw acrosomal integrity was less than 5% in the present study. However, Rodrigues (1997) previously reported that not all stages of acrosomal damage could be identified by phase contrast microscopy.

Plasma membrane integrity is essential for cell viability, as its selective permeability of the plasma membrane maintains intracellular metabolic activities, pH and ionic composition (Rota *et al.*, 1997). Using the CFDA/PI staining, Rota *et al.* (1997) found 56% intact sperm membrane for canine frozen-thawed semen and we verified 46% intact sperm membrane in the present study. These results represent a high rate of non-intact plasma membrane, which could indicate different stages of sperm activation (Colenbrander *et al.*, 2003). In fact, capacitation-like changes in dog semen seem to be both initiated and accelerated by cryopreservation (Rota *et al.*, 1999). Although the changes caused by freezing and thawing most likely represent acrosomal degradation, Strom *et al.* (1997) do not exclude the possibility that spermatozoa might still retain their fertilizing ability if these changes are only minor. Moreover, there are indications that in the canine species, both acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa are capable of binding to the zona pellucida (Kawakami *et al.*, 1993).

In spite of the advances in TEM, there are few studies presenting a systematic description of the canine spermatozoa. The occurrence of slightly swollen plasmalemma above the acrosomal region observed in fresh canine spermatozoa in the present study was previously reported by Chirinéa *et al.* (2005). These authors considered this to be a consequence of the semen sample being exposed to glutaraldehyde during the fixation procedure for TEM. Moreover, canine spermatozoa undergo several alterations in the head region after cryopreservation, but the plasmalemma seems to remain intact. Similar results were reported by Rodriguez-Martinez *et al.* (1993) and they suggested that the plasmalemma remaining intact after cryopreservation might account for the low percentage of acrosomal defects usually reported when using phase contrast microscopy.

Our results showed that the undulating acrosomal membrane seems to be a common consequence of cryopreservation in dog spermatozoa, as reported by Burgess *et al.* (2001). Vesiculation in acrosomal membranes and loss of acrosomal contents observed in our study with frozen semen could be a result of acrosomal reaction by the fusion of the plasma membrane with the outer acrosomal membrane (Eilts, 2005). In fact, Rodriguez-Martinez *et al.* (1993) suggested that the alterations found in the fine structural appearance of canine frozen semen could be interpreted as a false acrosomal reaction.

We demonstrated that the plasmalemma of the midpiece region of canine spermatozoa undergoes the same swelling effects as the head region, as previously reported by Burgess *et al.* (2001). To our knowledge, the present study is the first report describing the consequences of cryoinjury on the fine structural appearance of the mitochondrial sheath in the midpiece region of

the canine frozen spermatozoa by TEM. The mitochondrial sheath was unorganized, but the axoneme seemed to remain intact in frozen samples. In humans, it is known that abnormalities in the mitochondrial sheath can directly affect the sperm motility (Rao *et al.*, 1989). Alterations in the mitochondrial sheath resulting from freezing-thawing procedures could also possibly damage the post-thaw sperm motility in canine semen.

Although sperm motility analysis was not the main objective of this study, it is necessary to emphasize that the values after thawing (60%) were within the acceptable range for use in artificial insemination (Morton and Bruce, 1989). The CASA system also analyzed elongation, a sperm morphometric parameter expressing the average value of the ratio of minor to major axis of the sperm head. Values found in present work (54%) were within the normal range for canine sperm, reported as being between 47.6 and 67% (Rijsselaere *et al.*, 2004). The other sperm morphometric parameter was the area, i.e., the average size of all sperm heads in square microns, and they were similar to those reported by Iguer-Ouada and Verstegen (2001), but smaller than those reported by Rijsselaere *et al.* (2004). According to Dahlbon *et al.* (1997), sperm head morphometry was significantly variable among individuals and the limits for sperm head dimensions still have to be established in dogs.

The number of replicates used in this study was enough for the analysis of several sperm cells. Moreover, it was also enough to reach our intent of describing and discussing the main effects of cryoinjury in frozen-thawed canine spermatozoa, using different methods to evaluate sperm morphology. From all these data, we can conclude that cryopreservation induces a series of morphological alterations in canine sperm, but some of these alterations can only be determined by a profound analysis of the fine structural appearance of the sperm cell. Furthermore, we suggest the combined evaluation of multiple morphological parameters and fine structural appearance for the canine semen analysis.

Acknowledgments

The authors thank Capes by grants and CNPq for financial support, DVM Daniel C. Uchoa (Grande Canafístula Kennel) for providing the animals used in the experiment and Institute of Biosciences (IB-Unesp/Botucatu) for technical assistance regarding to transmission electronic microscopy.

References

Burgess, C.M., Bredl, J.C.S., Plummer, J.M., England, G.C.W. 2001. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57, 357-363.

- Chirinéa, V.H. 2004. Efeito do meio de congelação sobre as características morfo-funcionais do sêmen canino. Thesis, Máster of Sciences. Universidade Estadual Paulista - Botucatu, Brazil. 56p.
- Chirinéa, V.H., Martins, M.I.M., Souza, F.F., Tebet, J.M., Papa, F.O., Lopes, M.D, 2005. Structural changes of canine sperm submitted to freezing process. In: Proc.16th Cong. Bras. Reprod. Anim. Brazil, p.1.
- Colenbrander, B., Gadella, B.M., Stout, T.A.E., 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 38, 305-311.
- Dahlbon, M., Andersson, M., Vierula, M., Alanko, M., 1997. Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. *Theriogenology* 48, 687-698.
- Eilts, B.E., 2005. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology* 64, 685-691.
- England, G.C.W., Plummer, J.M., 1993. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47, 261-270.
- Farstad, W., 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 251-260.
- Ferguson, J.M., Renton, J.P., Farstad, W., Douglas, T.A., 1989. Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J. Reprod. Fertil.* 39, 293-298.
- Gao, G.Y., Ashworth, E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P., Critser, J.K., 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.* 49, 112-123.
- Holt, W.V., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
- Iguer-Ouada, M., Verstegen, J.P., 2001. Evaluation of the "Hamilton Thorn Computer-Based Automated System" for dog semen analysis. *Theriogenology* 55, 733-749.
- Ivanova-Kicheva, M.G., Bobadov, N., Somlev, B., 1997. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5ml aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology* 48, 1343-1349.
- Kawakami, E., Vandervoort, C.A., Mahi-Brown, C.A., Overstreet, J.W., 1993. Induction of acrosome reaction of canine spermatozoa by homologous zona pellucida. *Biol. Reprod.* 48, 841-845.
- Morton, D.B., Bruce, S.G., 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 39, 311-316.
- Oettlé, E.E., 1993. Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil.* 47, 257-260.
- Peña-Martinez, I., 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 209-224.
- Rao, B., Soufir, J.C., Martin, M., David, G. 1989. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res.* 24:127-34.

- Rijsselaere, T., Van-Soom, A., Hoflack, G., Maes, D., Kruif, A., 2004. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* 62, 1292-1306.
- Rodrigues, B.A. 1997. Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado. Thesis, Master of Sciences, Veterinary Faculty of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, 176p.
- Rodriguez-Martinez, H., Ekwall, H., 1989. Quantitative energy x-ray microanalysis in biopsies of porcine myometrium after cryo-fixation. *J. Ultrastruc. Mol. Struc. Res.* 102, 299.
- Rodriguez-Martinez, H., Ekwall, H., Linde-Forsberg, C., 1993. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47, 279-285.
- Rota, A., Peña, A.I., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H., 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlorthetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 57, 199-215.
- Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H., 1997. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 47, 1093-1101.
- Sanchez, R., Risopatrón, J., Sepulveda, G., Pena, P., Miska, W., 1995. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa: effects of proteinase inhibitors. *Theriogenology* 43, 761-768.
- Seager, S.W.J., 1986. Artificial insemination in dogs. In: Burke, T.J. (Ed). *Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment*, Lea & Febiger, Philadelphia, 207-217.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M., 2002. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The Vet. J.* 164, 244-246.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M., 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59, 821-829.
- Strom, B., Rota, A., Linde-Forsberg, C., 1997. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48, 247-256.

10. DISCUSSÃO GERAL

a) Sobre os animais utilizados nos experimentos

Os cães machos doadores de sêmen utilizados em todos os experimentos foram provenientes do canil Grande Canafístula, localizado na região metropolitana de Fortaleza, Ceará. Procurou-se utilizar sempre cães de uma mesma raça, no caso a raça Boxer. Entretanto, devido à falta de um animal dessa raça nos experimentos referentes aos Capítulos 01, 03 e 04, fez-se uso também de um cão da raça Fila Brasileiro. Cada animal passou previamente por uma seleção que consistiu de uma avaliação clínica e andrológica. Além disso, por ocasião de cada coleta, o estado geral do animal foi novamente observado e os parâmetros macroscópicos de cor, volume e viscosidade, bem como os microscópicos de motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática foram avaliados. Para todos os experimentos, foi estabelecido um limite mínimo de qualidade para uso das amostras de sêmen, onde essas deveriam apresentar um volume mínimo que permitisse sua divisão em alíquotas de igual volume a serem utilizadas em todos os tratamentos para cada experimento, motilidade espermática sempre superior a 80% e concentração espermática superior a 200×10^6 espermatozoides/mL. De acordo com os valores observados nos resultados de todos os experimentos, os parâmetros avaliados no sêmen fresco encontravam-se dentro da faixa normal descrita para a espécie canina (Oetlé, 1993; Johnston *et al.*, 2001).

As cadelas doadoras de oócitos utilizadas no Capítulo 03 pertenciam à comunidade da cidade de Botucatu, estado de São Paulo, e eram pacientes de uma campanha de castração em massa realizada pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP), naquela mesma cidade, onde o experimento foi realizado entre os meses de agosto e outubro de 2004. Previamente a cada castração, que acontecia mensalmente, as pacientes eram submetidas a uma avaliação geral do estado clínico e sanitário, para então serem preparadas para a cirurgia. A equipe responsável pelo procedimento cirúrgico era composta por alunos e professores do Hospital Veterinário daquela universidade. Antes do início das cirurgias, era deixado um recipiente contendo solução salina aquecida a 38°C dentro de uma caixa térmica, com um dos membros da equipe para a coleta dos tratos reprodutivos das cadelas. À retirada dos tratos reprodutivos, estes eram encaminhados para o Laboratório de Fertilização In Vitro daquela universidade, onde se dava início ao seu processamento. O intervalo entre a retirada do trato reprodutivo e o início do experimento nunca foi superior a duas horas. Vale salientar aqui, que nós

não tivemos acesso aos dados referentes à idade, peso, raça, ou estágio reprodutivo das cadelas. Em todo caso, Rodrigues *et al.* (2004) já haviam demonstrado que oócitos viáveis poderiam ser obtidos de cadelas em diferentes estágios reprodutivos, visto que os embriões caninos produzidos a partir de fertilização *in vitro* são mais dependentes do programa de desenvolvimento intrínseco do oócito do que das condições da cadela no momento da coleta desses oócitos.

b) Efeito da diluição espermática

De um modo geral, as pesquisas em tecnologia de sêmen canino utilizam uma taxa de diluição baseada em uma concentração espermática pré-fixada (Peña and Linde-Forsberg, 2000; Tsutsui *et al.*, 2000; Bueno *et al.*, 2001; Sirivaidyapong *et al.*, 2001), que possibilita calcular o número de espermatozoides por palheta e determinar a exata proporção entre o diluente e as células espermáticas. Por outro lado, outras pesquisas têm se baseado em uma proporção de volume fixo, entre diluente e sêmen (Silva & Verstegen, 1995; England & Ponzio, 1996; Yildiz *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003), onde não existe necessidade de se contar os espermatozoides, rendendo mais praticidade ao procedimento e reduzindo o tempo e os custos envolvidos com a congelação do sêmen canino.

Em trabalhos anteriores (Silva *et al.*, 2000, 2002cd, 2003), foi feito uso da diluição volume:volume devido à praticidade, uma vez que realizávamos a coleta de sêmen em canis distantes de nosso laboratório. Entretanto, sempre permanecia a dúvida a respeito da utilização de uma concentração espermática pré-fixada. Por isso, no Capítulo 01 desta tese, foram comparadas essas duas diferentes formas de diluição de sêmen canino destinado à criopreservação. Segundo os resultados encontrados, não existem diferenças entre as duas formas de diluição do sêmen canino. Isso mostra que a proporção entre diluente e sêmen em ambas as situações não traz danos à qualidade seminal. Segundo Mann (1964), uma diluição excessiva poderia levar a uma perda permanente da motilidade, da atividade metabólica e da capacidade fertilizante da célula espermática. Além disso, pesquisas recentes têm demonstrado que as proteínas do plasma seminal são importantes para a manutenção da viabilidade seminal de ovinos, prevenindo os danos oriundos do choque térmico sobre a membrana espermática (Barrios *et al.*, 2000; Pérez-Pé *et al.*, 2001). A partir desse conhecimento, poderíamos hipotetizar que uma diluição excessiva minimizaria os efeitos benéficos de substâncias presentes dos fluidos testiculares e epididimários que compõem a fração espermática em cães. De fato, sabe-se que altas taxas de diluição, tais como de uma parte de sêmen para 16 ou 32 partes de diluente, causam um decréscimo significativo na motilidade progressiva no sêmen de cães (Wales and White, 1963; England, 1993).

Em suma, dentro das condições descritas no experimento, o sêmen canino pode ser eficientemente diluído a uma concentração fixa de 200×10^6 espermatozóides/mL, ou a uma diluição baseada em um volume fixo, na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de diluente. A partir desses resultados, no experimento referente ao Capítulo 02, foi utilizada a diluição baseada em volume fixo. Entretanto, como no teste de interação entre espermatozóides e oócitos, era necessário o conhecimento do número de espermatozóides na palheta de sêmen, foi feito uso da concentração espermática pré-fixada nos experimentos referentes aos Capítulos 03 e 04, visto que os mesmos foram desenvolvidos em conjunto.

c) Temperatura de adição de glicerol

Existem escassas e controversas informações a respeito da temperatura de adição de glicerol ao sêmen de cães. As diferentes pesquisas preconizam o uso de temperaturas que vão desde próximas à corpórea (Peña *et al.*, 1998; Nothling and Shuttleworth, 2005) ou à ambiente (Yildiz *et al.*, 2000; Rota, 1998) até temperaturas de resfriamento (Silva *et al.*, 2003; Rota *et al.* 2005).

Em trabalhos anteriores (Silva *et al.* 2000, 2002cd, 2003), foi utilizada a temperatura de 4°C, uma vez que a metodologia utilizada era baseada naquela primariamente desenvolvida para o uso do diluente à base de água de coco em caprinos (Nunes *et al.*, 1997) e posteriormente adaptada para uso no cão (Silva *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2001). Entretanto, acreditava-se que a adição do crioprotetor ao sêmen em uma temperatura mais elevada, no caso a temperatura ambiente (27°C), poderia além de não trazer prejuízos ao sêmen canino, também conferir maior praticidade ao procedimento de criopreservação. Desse modo, o experimento reportado no Capítulo 02 desta tese consistiu no primeiro trabalho a comparar a temperatura ambiente (27°C) e aquela após a etapa de resfriamento (4°C) para a adição do glicerol durante o procedimento de criopreservação de sêmen canino. Esse experimento demonstrou que não existem diferenças entre as mesmas no tocante à motilidade, morfologia, integridade acrossomal, função de membrana e longevidade espermáticas após a descongelação. Esses resultados são similares àqueles reportados por Peña *et al.* (1998), os quais não encontraram diferenças entre uma temperatura próxima à corpórea (37°C) e 4°C para adição do glicerol, com relação à motilidade espermática, porcentagem de espermatozóides vivos e integridade acrossomal.

Os resultados aqui obtidos são ainda importantes por mostrarem ser desnecessária a manutenção das amostras de sêmen e do diluente em banho-maria a temperaturas controladas, normalmente de 37°C, antes do início da congelação. Além disso, verifica-se também ser desnecessário o abaixamento da temperatura antes da adição do glicerol, denotando que um diluente

já adicionado de glicerol poderia ser adicionado ao sêmen canino à temperatura ambiente. Esses achados podem ser explicados pelo fato de ter sido previamente demonstrado que o espermatozóide canino tolera a exposição a soluções hipertônicas à base de crioprotetores permeáveis, em especial o glicerol (Songsassen *et al.*, 2001). De fato, Hammersted *et al.* (1990) sugeriram que o glicerol penetra muito rapidamente nas células espermáticas e que um tempo de equilíbrio seria desnecessário.

A possibilidade de adição do diluente contendo glicerol ao sêmen canino à temperatura ambiente de 27°C, bem como a não necessidade de manutenção dos mesmos em banho-maria antes do início do processamento, conferem uma maior praticidade ao procedimento de criopreservação. Entretanto, apesar de ser sugerido o uso da temperatura de 27°C para adição do diluente glicerolizado ao sêmen canino, nos experimentos posteriores, referentes aos Capítulos 03 e 04, optou-se por fazer uso ainda da adição de glicerol à temperatura de 4°C. Isto se deve ao fato de que estava sendo desenvolvido um trabalho em paralelo com o diluente à base de água de coco, que preconiza o uso dessa temperatura.

d) Motilidade espermática

Na maioria das pesquisas realizadas na área de tecnologia de sêmen canino, a avaliação da motilidade espermática continua sendo o principal parâmetro avaliado após a descongelação por diversos pesquisadores. Essa avaliação se baseia na mensuração da porcentagem de espermatozoides móveis na amostra através da microscopia óptica (Seager and Fletcher, 1972) e é eventualmente acompanhada da avaliação do vigor (Hermann & Swanson, 1941; Platz and Seager, 1977; Christiansen, 1986, Jonhston *et al.*, 2001), que representa a intensidade de movimento dos espermatozoides em escalas que variam desde zero (sem movimentos) a cinco (movimento progressivo contínuo). Entretanto a avaliação desses parâmetros através da microscopia óptica oferece limitações primárias como a subjetividade e a variabilidade (Rijsselaere *et al.*, 2005). A determinação subjetiva da motilidade espermática pode ser influenciada pela temperatura de avaliação e pela habilidade do avaliador, levando a uma alta variabilidade entre os laboratórios (Iguer-Ouada and Versteegen, 2001).

Nos Capítulos 01 e 02 do presente trabalho, a motilidade espermática nas amostras de sêmen foi avaliada apenas subjetivamente através da microscopia óptica. Foi então verificado um declínio significativo da motilidade a cada etapa do processamento do sêmen e, principalmente, após a descongelação, bem como no decorrer do teste de termorresistência. Esse declínio é provavelmente decorrente de uma soma de fatores, como a formação de cristais de gelo que ocorre entre -6 e -10 °C

(Colas, 1975); a ação tóxica do glicerol que pode causar alterações físico-químicas e osmóticas que levam à ruptura da membrana espermática, à remoção de importantes proteínas da membrana, ao rearranjo de íons e a alterações na bi-camada lipídica proteica (Holt, 2000); bem como o choque térmico, oriundo das diversas modificações na temperatura ao qual o espermatozóide é submetido durante a congelação e descongelação (Farstad, 1996). É necessário ainda relatar que a partir do experimento referente ao Capítulo 02, abolimos o uso da avaliação do vigor espermático, uma vez que as publicações internacionais atualmente têm se concentrado apenas na análise da motilidade, sem levar em conta esse parâmetro.

Já nos Capítulos 03 e 04, trabalhou-se com a análise computadorizada de sêmen (CASA). A CASA foi proposta pra suplantiar o obstáculo de subjetividade nas análises de sêmen e vem sendo utilizado em diversas espécies, incluindo o cão (Iguer-Ouada and Versteegen, 2001). No presente trabalho, foi utilizado o Hamilton Thorn Analyzer Ivos 10, sendo possível a mensuração de diferentes padrões da motilidade espermática, como velocidade média na trajetória (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL), progressão (STR), linearidade (LIN), deslocamento lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimento de cauda (BCF). Além disso, foi possível identificar a presença de diferentes subpopulações que compõem as amostras de sêmen canino após a descongelação, tal qual previamente observado por outros autores (Quintero-Moreno *et al.*, 2004). Isso evidencia que os espermatozóides oriundos de uma mesma amostra de sêmen respondem de maneira diferenciada aos danos oriundos dos processos de congelação e descongelação. Em suínos e gazelas, Abaigar *et al.* (1999) sugerem que a divisão dos espermatozóides que compõem um ejaculado em diferentes subpopulações é originada na espermatogênese, quando a heterogeneidade genotípica é ainda capaz de afetar a qualidade das células espermáticas.

Um dos objetivos dessa tese foi estabelecer as relações entre os diferentes testes utilizados para a avaliação da qualidade espermática após a descongelação. Nesse sentido, no Capítulo 02, observou-se a existência de correlações entre a motilidade espermática avaliada imediatamente após a descongelação e aquela avaliada aos 60 e 120 minutos, no decorrer do teste de termorresistência. Esse resultado mostra que quanto maior a motilidade imediata do sêmen após a descongelação, maior será a sua longevidade. Além disso, foram também verificadas correlações entre a motilidade espermática e a função de membrana avaliada pelo teste hipo-osmótico (HOST), sugerindo que a manutenção da função da membrana plasmática é essencial para a manutenção da motilidade espermática após a descongelação. Resultados similares foram também descritos por Rota *et al.* (2005), mas a existência de correlações entre o HOST e os testes de fertilidade *in vivo* ou *in vitro* na espécie canina permanece por ser verificada (Peña-Martinez, 2004).

Já no Capítulo 03, observou-se que alguns padrões de motilidade espermática pós-descongelamento avaliada pela CASA apresentam relações significativas com os resultados do teste de interação entre espermatozoides e oócitos. Esses padrões são: a frequência de batimento de cauda (BCF), velocidade média na trajetória (VAP) e velocidade progressiva linear (VSL). Esses resultados concordam com aqueles descritos por Herrera *et al.* (2004), que demonstraram que a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e total determinada pela CASA apresenta uma relação linear significativa com a fertilidade *in vitro* em bovinos, mas os parâmetros de VAP, LIN e BCF não apresentam tal relação. Esses autores sugerem que a CASA poderia então ser utilizada para prever a fertilidade na espécie bovina.

Por outro lado, a inexistência de relações entre a CASA e os testes de fertilidade *in vivo* já foi descrita para a espécie suína (Quintero-Moreno *et al.*, 2004) e equina (Kirk *et al.*, 2005). Além disso, Oehninger *et al.* (2000) sugeriram que é difícil expressar as reações entre os parâmetros avaliados pela CASA com a fertilidade *in vitro*, uma vez que a CASA ou qualquer outro método de análise espermática examina populações espermáticas (Suzuki e Nagai, 2003).

Paralelamente à realização da CASA, foi também realizada a análise subjetiva da motilidade espermática nas amostras de sêmen descongelado, permitindo o estabelecimento de uma comparação entre os dois métodos. Esses dados comparativos não se encontram apresentados na presente tese e deverão ser publicados no futuro. No uso da CASA observou-se após a descongelamento uma motilidade progressiva de $57,3 \pm 8,1\%$ e total de $68,7 \pm 9,3\%$. Já no uso da microscopia óptica, a motilidade espermática observada foi de $63 \pm 8,3\%$. Comparações entre os métodos mostraram não existir diferenças significativas (teste t de Student, $P > 0,05$) entre os resultados da microscopia óptica e ambos os dados mostrados pela CASA. Essa proximidade de resultados entre os dois métodos já havia sido previamente relatada por Iguer-Ouada e Verstegen (2001). Esses resultados mostram que a subjetividade imposta à análise por microscopia óptica permite variações na avaliação da amostra de sêmen, denotando valores que se situam entre a motilidade total e a progressiva, verificadas pela CASA. O resultado dessa comparação é importante porque permite uma validação das análises subjetivas realizadas nessa tese, certificando os resultados verificados para esse parâmetro nos Capítulos 01 e 02.

e) Teste de termorresistência e efeito da adição de diluente após a descongelação

Nos capítulos 01 e 02 desta tese foram realizados testes de termorresistência no sentido de se avaliar a longevidade espermática. Em ambos verificou-se um declínio gradual da motilidade espermática no decorrer do período de incubação. Conforme visto no Capítulo 02, por volta de 60 minutos após a descongelação, havia ainda em torno de 30% de espermatozóides móveis nas amostras, permitindo o uso das mesmas para a realização de inseminações (Concannon e Battista, 1989), sendo indicada a via intra-uterina nesse momento. Além disso, vale salientar que no caso da realização de uma inseminação imediatamente após a descongelação do sêmen, estando a cadela no momento ideal, os valores de motilidade imediata após a descongelação associados a essa longevidade espermática seriam mais que suficientes para a ocorrência da fertilização, haja vista que Tsutsui *et al.* (1989) mostraram que os espermatozóides caninos podem atingir o corno uterino até dois minutos após a deposição vaginal. Vale ainda ressaltar que a presença de relações entre a longevidade espermática e o potencial fertilizante do sêmen não foi ainda descrita para a espécie canina, conforme já verificada, por exemplo, em humanos (Alvarez *et al.*, 1996).

A partir dos resultados de termorresistência obtidos em um trabalho anterior (Silva *et al.*, 2003) e no Capítulo 01 desta tese, objetivou-se testar o efeito da adição de diluente ao sêmen após a descongelação, pois se acreditava que a adição do diluente poderia diminuir a ação tóxica do glicerol sobre a célula espermática durante a incubação, melhorando assim a longevidade espermática. Além disso, Peña e Linde-Forsberg (2000) haviam sugerido que a diluição pós-descongelação melhoraria a longevidade espermática. Desse modo, no Capítulo 02, foi demonstrado que a adição do diluente ao sêmen descongelado, em uma proporção de uma parte do sêmen para quatro partes do diluente, não trás benefício e nem prejuízo à longevidade ou à morfologia espermáticas. Esses dados mostraram que é desnecessária a diluição pós-descongelação para a realização do teste de termorresistência. Porém, havendo necessidade de expandir o volume seminal para a realização de inseminação artificial intravaginal, a adição do diluente não iria trazer prejuízo à qualidade espermática. Provavelmente, esses resultados foram diferentes daqueles encontrados por Peña e Linde-Forsberg (2000) devido ao fato que esses autores adicionaram o Equex (Nova Chemical Sales Inc., Siquate, MA, USA) ao diluente, o qual previamente já tinha sido demonstrado que tinha um efeito de prolongar a longevidade espermática em cães (Rota *et al.*, 1997).

É necessário ressaltar que foi verificada, no Capítulo 02, a existência de interações entre o efeito individual do cão doador de sêmen e o período de incubação. Provavelmente, do mesmo modo que os diferentes cães apresentam uma diferente sensibilidade à congelação de sêmen, os mesmos também devem apresentar uma diferente resistência à incubação por longo período em

temperaturas pré-determinadas, para a realização do teste de termorresistência. Entretanto, os fatores que determinam essas diferenças permanecem por serem elucidados.

f) Múltiplos parâmetros morfológicos dos espermatozoides caninos

Segundo Oettlé (1993), a fertilidade em cães só seria afetada caso amostras de sêmen com menos de 60% de espermatozoides normais fossem utilizadas em inseminações artificiais. Nos quatro experimentos que compõem esta tese, observou-se que o procedimento de congelação adotado foi eficiente em preservar a morfologia espermática. Entretanto, no primeiro trabalho a taxa de morfologia espermática normal após a descongelação (74%) foi inferior àquela encontrada nos demais experimentos (85%). Naquele trabalho foram utilizados esfregaços de sêmen corados com Eosina-Nigrosina, o qual nós constatamos ter uma boa qualidade tintorial, porém permitindo a presença de muitos debris e sujidades que dificultavam a leitura da lâmina. Além disso, o processo de manufatura do esfregaço, que consistia no rolamento de um swab impregnado de sêmen por sobre a lâmina, também aumentava a ocorrência de destacamento de cauda, tanto no sêmen fresco quanto no descongelado. Segundo Dott e Foster (1972), a coloração de Eosina-Nigrosina permitiria a distinção de espermatozoides vivos e mortos. No entanto, observamos que as diferenças tintoriais entre os espermatozoides vivos e mortos são muito sutis e difíceis de serem avaliadas, e por isso esse parâmetro não foi incluso no presente trabalho.

A partir do experimento 02, foi feito uso do corante Rosa de Bengala (Rodrigues, 1997), o qual permite não apenas a visualização da morfologia espermática, mas também a avaliação da integridade do acrossoma. O seu processo de manufatura consistia em diluir 0,5µL de sêmen em 75µL de Rosa de Bengala e em seguida colocar uma gota dessa solução sobre lâmina e recobrir com lamínula fixada com esmalte. Esse procedimento pareceu não induzir o destacamento da cauda dos espermatozoides e, além disso, mostrava uma excelente qualidade tintorial.

Em todos os trabalhos, as principais alterações morfológicas espermáticas observadas no sêmen descongelado foram cabeças destacadas, peças intermediárias dobradas, caudas quebradas e enroladas, e defeitos acrossomais. Esses defeitos consistiam em alterações secundárias (Seager, 1986), provavelmente originadas do choque térmico e do estresse osmótico provocado pelos procedimentos de congelação e descongelação (Farstad, 1996), bem como da manipulação do sêmen.

O corante Rosa de Bengala foi também eficiente em permitir a visualização do acrossoma e a identificação de diferentes alterações morfológicas nessa estrutura. Dentre essas alterações, a mais

presente no sêmen descongelado foi a edemaciação dos acrossomas. Entretanto, é necessário enfatizar que nem todos os estágios do dano acrossomal podem ser identificados através da microscopia de contraste de fase (Rodrigues, 1997), sendo assim sugerido o emprego de outras técnicas mais eficientes, como a epifluorescência e a microscopia eletrônica.

A integridade da membrana plasmática é essencial para a viabilidade celular, uma vez que a permeabilidade seletiva da membrana é responsável pela manutenção da atividade metabólica intracelular, do pH e da composição iônica da célula (Rota *et al.*, 1997). Nos Capítulos 03 e 04 foi utilizada a solução CFDA/PI para a avaliação da integridade da membrana plasmática e observou-se que a porcentagem de espermatozoides com membrana não intacta após a descongelação sobrepunha a de espermatozoides com membrana intacta. Colembrander *et al.* (2003) havia previamente relatado que essa maior incidência de membranas plasmáticas não intactas poderia ser um indicativo de diferentes estágios da ativação espermática. De fato, as modificações indicativas de capacitação observadas no sêmen canino podem ser tanto iniciadas quanto aceleradas pelos procedimentos de preservação (Rota *et al.*, 1999). Vale ainda salientar que atualmente alguns laboratórios têm feito uso da Citometria de Fluxo, que permite uma análise mais acurada que aquela realizada pela microscopia convencional de fluorescência, visto que realiza a avaliação de diversos parâmetros morfológicos através da análise sistemática de um grande número de células (Rota *et al.*, 1998).

O Capítulo 03 mostrou não existirem relações significativas entre morfologia espermática e integridade acrossomal com os resultados do teste de interação entre espermatozoides e oócitos. Esse fato é indicativo que a avaliação isolada de tais parâmetros não é suficiente para prever a fertilidade das amostras de sêmen canino.

Não foram também observadas relações entre as interações espermatozoides-oócitos e a integridade de membrana plasmática. Uma possível justificativa para isto refere-se ao fato de que fora previamente demonstrado que o espermatozóide canino portador de membrana intacta ou não-intacta poderia ligar-se à zona pelúcida de oócitos (Kawakami *et al.*, 1993). De fato, Strom *et al.* (1997) sugerem que o espermatozóide canino poderia reter seu potencial fertilizante, caso as alterações na membrana plasmática fossem mínimas. Assim, poderíamos inferir que pequenas alterações permitiriam a entrada do iodeto de propídio, manifestando a fluorescência em vermelho, e caracterizando a célula como portadora de uma membrana não-intacta, mas a sua capacidade fertilizante poderia ainda estar preservada.

Finalmente, foram também avaliados os parâmetros morfológicos Área e Alongamento, através da análise computadorizada (CASA). Entretanto, esses parâmetros são de difícil interpretação (Rijsselaere *et al.*, 2004). Além disso, Dahlbon *et al.* (1997) demonstraram haver uma grande variação individual entre os cães com relação às dimensões da cabeça de seus espermatozoides, dificultando ainda mais a interpretação desses parâmetros morfométricos.

g) Teste hipo-osmótico

O teste hipo-osmótico (HOST) avalia a integridade funcional da membrana espermática (Spittaler e Tyler, 1985), sendo essa importante para o metabolismo espermático. Essa análise é um teste de endosmose que determina as mudanças na membrana espermática, onde o transporte através dessa é um processo bioquímico importante para a viabilidade espermática e capacidade fertilizante (Jeyendran *et al.*, 1992). Alguns autores demonstraram que a resposta osmótica do sêmen fresco estaria correlacionada com a fertilidade em algumas espécies (Jeyedran *et al.*, 1992; Revell and Mrode, 1994; Perez-Llano *et al.*, 2001). Na espécie canina, a presença de correlações dos resultados do HOST no sêmen fresco ou descongelado, com a fertilidade *in vivo* ou *in vitro* ainda não foi avaliada (Peña-Martinez, 2004).

No capítulo 02 desta tese, observou-se que o procedimento de criopreservação promove uma redução da resposta osmótica dos espermatozoides caninos. Além disso, foi verificada a presença de correlações significativas entre a resposta osmótica do sêmen canino descongelado e sua motilidade imediata após a descongelação. Isso mostra que a manutenção da função da membrana plasmática é de suma importância para a manifestação da motilidade espermática.

É necessário ainda enfatizar que a pressão osmótica do composto formado por 0,01 mL de sêmen descongelado diluído em 0,09mL da solução hipo-osmótica (150mOsm/L), utilizado no Capítulo 02, foi mensurada, tendo sido verificados 280mOsm/L. Possivelmente, o HOST para o sêmen congelado/descongelado não costuma ser realizado sob as mesmas condições que aquele para o sêmen fresco, onde os espermatozoides estavam realmente submetidos a uma solução com 150mOsm/L. Provavelmente, essa osmolaridade de 280mOsm/L deve-se à presença de gema de ovo e glicerol no diluente do sêmen, uma vez que Hammerstedt *et al.* (1990) reportaram que a adição dessas substâncias ao diluente Tris proporcionava uma alta osmolaridade de até 1300mOsm/L. Desse modo, a resposta de enrolamento de cauda espermática observada após a descongelação deveu-se principalmente ao choque osmótico da passagem abrupta dos espermatozoides de um meio contendo 1300mOsm/L para 280mOsm/L. Outros autores sugerem o uso de soluções hipo-osmóticas de 55mOsm/L (Sanchez *et al.*, 2002) ou até mesmo 0mOsm/L

(Quintela *et al.*, 2004), no intuito de obter uma melhor resposta osmótica dos espermatozóides descongelados. Entretanto, a aplicação do HOST para o sêmen canino descongelado deve ainda ser melhor estudada.

h) Aparência ultra-estrutural espermática

Apesar dos avanços da microscopia eletrônica, existem pouquíssimos trabalhos aplicando essa técnica para a avaliação de espermatozóides caninos (Oetlé, 1993; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1993; Chirinéa *et al.*, 2005). Esses trabalhos detinham-se principalmente à avaliação da cabeça dos espermatozóides, e em apenas um deles foram observados os efeitos da crioinjúria sobre a membrana plasmática da peça intermediária das células espermáticas (Burgess *et al.*, 2001). Nesse sentido, esta tese apresenta no Capítulo 04, a primeira descrição dos danos causados pela criopreservação na estrutura interna da peça intermediária dos espermatozóides caninos. Foi verificado que esta região espermática apresenta edemaciação da membrana plasmática similar àquela observada na região da cabeça. Além disso, a bainha mitocondrial em alguns espermatozóides apresenta uma desorganização estrutural, porém o axonema se mantém intacto. Com relação à região da cabeça espermática, as alterações aqui encontradas foram similares às aquelas previamente descritas por outros autores (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1993; Chirinéa *et al.*, 2005).

A partir desses resultados, é possível destacar que a microscopia eletrônica permite a avaliação profunda da estrutura espermática e é capaz de evidenciar alterações ultra-estruturais que não são possíveis de serem identificadas por outras técnicas. Sendo assim, apesar do custo elevado desse procedimento, é recomendado que o mesmo passe a ser adotado em conjunto com outras técnicas de avaliação morfológica espermática.

i) Interação entre espermatozóides caninos congelados e oócitos homólogos

A ligação do espermatozóide à zona pelúcida é um evento crítico na interação gametogênica que culmina com a fertilização do oócito (Mayenco-Aguirre e Pérez-Cortes, 1998). Baseado neste fato, Hewitt e England (1997) sugeriram que o teste de interação espermatozóides-oócitos *in vitro* seria um forte indicativo para predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen. Entretanto, até então, as relações entre as interações gametogênicas iniciais e os demais parâmetros seminais ainda não tinham sido estudados na espécie canina.

No Capítulo 03 desta tese, observou-se uma alta taxa de interações (72%) entre espermatozóides caninos descongelados e oócitos homólogos, representada por 36% de espermatozóides penetrados nos oócitos e 57% apenas ligados à zona pelúcida. Esses resultados são indicativos de que o espermatozóide canino, após os procedimentos de congelamento e descongelamento, retêm sua capacidade fertilizante. Porém, uma vez que a viabilidade espermática encontra-se reduzida após descongelamento, os espermatozóides não conseguiriam expressar eficientemente essa fertilidade após a realização de inseminações artificiais, conforme resultados mostrados na literatura (Silva *et al.*, 2003).

Os resultados de interações espermatozóides-oócitos encontrados nesse trabalho são similares aos encontrados por outros autores para o sêmen descongelado (De los Reyes *et al.*, 2004), mas são inferiores aos reportados para o sêmen fresco (Hewitt e England, 1997). De fato, sabe-se que os procedimentos de criopreservação e descongelamento comprometem a capacidade fertilizante do espermatozóide (Watson, 1995). Além disso, Hay *et al.* (1997) demonstraram que a própria adição do glicerol ao diluente durante o processo de congelamento do sêmen canino pode influenciar negativamente a taxa de penetração, uma vez que promove alterações na morfologia espermática e integridade de acrossoma e de membrana.

A metodologia utilizada para a realização do teste de interação entre espermatozóides e oócitos (Hay *et al.*, 1997) mostrou-se ser bastante prática e eficiente. No entanto, foi realizada uma modificação nesta técnica ao se utilizar o vortex para o desnudamento dos oócitos. A partir dos resultados obtidos, pode ser sugerida a não utilização deste equipamento, uma vez que esse procedimento provocou a perda de diversos oócitos.

Apesar de ser conhecido que o espermatozóide deva apresentar integridade de membrana e morfologia normal para que possa exibir sua capacidade fertilizante, o presente trabalho mostrou não haverem relações lineares entre a avaliação de tais parâmetros seminais e o teste de interação espermatozóides-oócitos na espécie canina. Por outro lado, alguns dos padrões de motilidade espermática avaliados pela CASA apresentaram tal correlação.

A avaliação de múltiplos parâmetros de sêmen tem sido constantemente revisada em diversas espécies (Peña-Martinez, 2004; Eilts, 2005; Rodriguez-Martinez, 2005). Os autores são unânimes em afirmar que maiores estudos são necessários para se estabelecer um teste *in vitro* capaz de prever o potencial fertilizante de uma amostra de sêmen, qualquer que seja a espécie. Inclusive, Oliveira (2003) sugere que apesar das técnicas utilizadas para a avaliação espermática após descongelamento apresentarem baixa ou nenhuma correlação entre si, elas permitem a análise de

propriedades individuais das células espermáticas, podendo ser então complementares e não excludentes. Desse modo, mesmo tendo sido estabelecidas relações entre a CASA e as interações espermatozóide-oócito *in vitro* no presente trabalho, sugere-se a avaliação de múltiplos parâmetros seminais, no intuito de predizer a capacidade fertilizante *in vitro* do sêmen canino.

j) Efeito individual do cão

No Capítulo 01 desta tese, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar se os animais utilizados no experimento faziam parte de uma população homogênea, ou seja, suas características seminais eram similares. Esse fato foi realmente constatado nesse trabalho. Entretanto, a partir do Capítulo 02, observamos que seria mais interessante verificar não apenas se os animais partiam de um mesmo ponto inicial, mas também se os mesmos exerciam algum tipo de influência sobre os resultados após a descongelação. Sendo assim, a estatística foi reformulada e passamos a fazer uso da análise de variância seguida do teste PSLD de Fisher para verificar a existência de um efeito individual do cão, e de interações desse efeito com os demais tratamentos, sobre os diferentes parâmetros avaliados no sêmen canino após a descongelação.

No decorrer da tese, observou-se que o efeito individual do cão incidia sobre diferentes parâmetros seminais, como motilidade imediata após a descongelação, alguns padrões de motilidade, populações espermáticas, longevidade, morfologia espermática, integridade acrossomal e interações entre espermatozoides e oócitos. Além disso, foram também observadas interações entre o efeito individual do cão e o período de incubação, durante a realização do teste de termorresistência. Esses resultados mostram que diferentes cães podem apresentar uma diferente sensibilidade aos procedimentos de congelação, tal qual previamente reportado para suínos (Gil *et al.*, 2005) e eqüinos (Kirk *et al.*, 2005).

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar a diferença de congelabilidade seminal entre os cães. Thurston *et al.* (2002) identificaram a presença de marcadores moleculares ligados a genes que controlariam a congelabilidade seminal em suínos, determinando variações individuais e entre diferentes raças. Entretanto, pesquisas dessa ordem não foram ainda desenvolvidas na espécie canina. Em adição, já foi identificado que os espermatozoides de diferentes cães apresentam diferenças quanto à permeabilidade de sua membrana plasmática, que pode se refletir em diferentes resultados após a descongelação (Yu *et al.*, 2002), mas não se sabe ainda qual fator determina essa diferença de permeabilidade na membrana celular, tal qual já estudado em suínos (De Leeuw *et al.*, 1990) e camundongos (Phelps *et al.*, 1999). Isso seria então um indicativo que novas pesquisas devam ser conduzidas no intuito de identificar o fator que

confere uma maior congelabilidade ao sêmen de determinados cães, possibilitando assim o aprimoramento dos protocolos de congelação seminal.

k) Considerações finais

Um protocolo de preservação adequado deve manter o potencial fertilizante das células espermáticas que deverão, ao final de todo o processo, apresentar a vitalidade necessária para atingir o local da fertilização e estarem aptas a concluir a capacitação e a reação acrossômica, que constituem o estágio final de maturação espermática e possibilitam a fecundação do oócito (Watson, 1995; Rota, 1998). Para se obter sucesso na congelação de sêmen é necessária a adição de um diluente que ajude a estabilizar o metabolismo celular, previna a capacitação espermática e a reação acrossômica precoces, e ofereça um ambiente favorável para a preservação da integridade e função de todos os compartimentos espermáticos e ainda da membrana plasmática dos espermatozoides (Watson, 1995; Watson, 2000). Nesse sentido, uma grande variedade de diluentes tem sido testada para a preservação de sêmen nas diferentes espécies.

A equipe do Laboratório de Reprodução de Carnívoros (LRC-UECE) tem trabalhado com o diluente Tris já há bastante tempo, seja ele o principal objeto de estudo (Silva *et al.*, 1998, 2002cd, 2003), ou simplesmente como o grupo controle em testes de diluentes alternativos (Silva *et al.*, 2000, 2004). É necessário enfatizar a grande praticidade de uso desse diluente, o qual é constituído por ingredientes de fácil aquisição comercial, a um custo relativamente baixo, e além disso, é de fácil preparo. Nos trabalhos que compõem a presente tese, foi preparado um volume de 100 mL do diluente Tris-frutose-ácido cítrico, divididos em alíquotas de 1,5 mL acondicionadas em tubos plásticos com tampa e armazenadas em freezer por até seis meses. Por ocasião de cada congelação, realizava-se então o descongelamento das amostras de Tris para uso no experimento, e fazia-se a adição da gema de ovos frescos de galinha e de glicerol. Após seis meses do preparo do diluente, era sempre preparado um novo volume do mesmo.

Em trabalhos anteriores, foi adaptada para a espécie canina, no uso do diluente Tris (Silva, 2001), uma metodologia de congelação previamente utilizada com o diluente à base de água de coco em caprinos (Nunes *et al.*, 1997), e no decorrer desse tempo, temos aperfeiçoado essa metodologia. Assim, nossos principais propósitos com a presente tese foram aprimorar esta metodologia e realizar diversas análises morfológicas e funcionais do sêmen descongelado, no intuito de verificar se essa metodologia de congelação foi realmente eficiente para preservar a qualidade espermática.

Com os resultados obtidos nesta tese, demonstramos que essa metodologia de congelamento, em associação com o diluente Tris, tem sido bastante eficiente em conservar a qualidade do sêmen canino após a descongelamento. Algumas descobertas conferiram uma maior praticidade ao método de congelamento, por exemplo, pela possibilidade de realização da diluição baseada em volume fixo, ou mesmo, através da adição do glicerol a uma temperatura ambiente de 27°C.

Além disso, essa tese tem um caráter inovador para a pesquisa científica por demonstrar a realização conjunta de diferentes testes de avaliação seminal, inclusive, ao estudar a existência de relações entre os mesmos. Além das convencionais análises de motilidade, morfologia, acrossoma, termorresistência e resposta osmótica, nesta tese foram utilizadas técnicas mais avançadas, como a análise computadorizada, microscopia de fluorescência, teste de interação entre espermatozoides e oócitos e microscopia eletrônica de transmissão. Assim, sugerimos a utilização conjunta de diferentes testes para a avaliação do sêmen canino, uma vez que os mesmos poderiam complementar-se. Mas salientamos que alguns padrões de motilidade avaliados isoladamente através da CASA apresentam relações significativas com os estágios iniciais da fertilização *in vitro* na espécie canina.

11. CONCLUSÕES

1. A diluição baseada em uma concentração espermática pré-fixada de 200×10^6 espermatozoides/mL e aquela baseada em um volume fixo na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de diluente (1:1) são igualmente eficientes para a criopreservação do sêmen canino.
2. O diluente contendo glicerol pode ser adicionado ao sêmen canino tanto à temperatura ambiente (27°C) quanto após o resfriamento (4°C), durante o procedimento de criopreservação.
3. Não existe necessidade de diluir o sêmen canino após a descongelação para a realização do teste de termorresistência, mas a adição do diluente Tris ao sêmen canino descongelado não promove danos à sua qualidade.
4. Alguns parâmetros de motilidade espermática avaliados pela análise computadorizada (CASA) apresentam relações significativas com as interações *in vitro* entre espermatozoides caninos congelados/descongelados e oócitos homólogos.
5. O procedimento de criopreservação induz uma série de alterações nas características morfológicas dos espermatozoides caninos, mas algumas destas alterações apenas podem ser verificadas através da avaliação da aparência ultra-estrutural da célula espermática.

12. PERSPECTIVAS

A cada dia, novas pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de aprimorar as biotécnicas reprodutivas já existentes. Assim, acreditamos que essa tese possa servir de base para pesquisas futuras realizadas por outros autores, no intuito de atingir ainda um maior avanço na tecnologia de sêmen canino. Os resultados obtidos neste trabalho também apontam a direção para futuras investigações relacionadas ao aprimoramento ou desenvolvimento dos testes de avaliação seminal, no intuito de se tentar prever a fertilidade *in vivo* das amostras de sêmen. Além disso, devido ter sido verificada a ocorrência de um efeito individual do cão doador de sêmen, é sugestiva a realização de estudos no sentido de se determinar a razão de existirem cães com diferentes sensibilidades à congelação de sêmen, e talvez assim aprimorar os protocolos existentes.

Durante a realização deste trabalho, nós nos deparamos com o obstáculo da impossibilidade de manutenção de cadelas em um número adequado para a realização de inseminações artificiais, para que pudéssemos então comprovar os resultados aqui obtidos através da fertilidade *in vivo*. No entanto, haja vista a similaridade e, em alguns aspectos, a superioridade dos resultados aqui apresentados em relação aos descritos na literatura, realmente acreditamos ser possível alcançar resultados de fertilidade *in vivo* bastante aceitáveis. Sendo assim, sugerimos que a metodologia apresentada nesse trabalho possa vir a ser utilizada em escala comercial, dentro da rotina de um laboratório ou banco de sêmen canino, possibilitando a manutenção e posterior difusão do material genético de reprodutores de alto interesse zootécnico ou afetivo, e permitindo a ocorrência de gestação em diversas cadelas.

Não poderíamos ainda deixar de destacar a possibilidade de aplicação dessa metodologia de congelação de sêmen em programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção. O armazenamento de material genético abre fronteiras para o estudo da preservação de espécies canídeas silvestres, sendo uma das principais formas de se aumentar a variabilidade genética (Johnston e Lacy, 1995). Nesse sentido, apresentamos um artigo em anexo que fala da possibilidade de adaptação de algumas biotécnicas desenvolvidas em pequenos animais para os carnívoros selvagens (Anexo 05).

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAIGAR, T., HOLT, W.V., HARRISSON, R.A.P., BARRIO, G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessment. **Biol. Reprod.** v.60, p.32-41, 1999.
- ALLEN, W.E. **Fertility and Obstetrics in the Dog**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992.
- ALTHOUSE, G.C., KO, J.C.H., HOPKINS, S.M., EVANS, L.E. Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. **JAVMA**, v.199, p.227-229, 1991.
- ALVAREZ, J.G.; MINARETZIS, D.; BRENT-BARRET, C. *et al.* The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive techniques. **Fertil. Steril.** v.65, p.400-405, 1996.
- AMMAN, R.P., HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **J Androl.** v.14, p.397-406, 1993.
- ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. **Zuchthygiene**, v.10, p.1-4, 1975.
- BADINAND, F., FONTBONNE, A., PETIT, C. L'insemination artificielle dans l'espece canine. In: **Proc. Reproduction Canine Paris**. p. 2-6. 1993.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M. *et al.* Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biol. Reprod.** v.63, p.1531-1537, 2000.
- BARTLETT, D.J. Studies on dog semen I: Morphological characteristics. **J. Reprod. Fertil.** v.3, p.173-188, 1962.
- BATES, R.G. Determination of pH: Theory and Practice, 2nd ed. New York: John Wiley and Sons Inc., 1962, 161p
- BATTISTA, M., PARKS, J., CONCANNON, P. Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using pipes, lactose, tris or test extenders. **Proc. 11° Int. Cong. Anim. Reprod. Art. Ins.**, v.3, p.229, 1988.
- BEDFORD, J.M., HOSKINS, D.D. The mammalian spermatozoon – Morphology, biochemistry and physiology. In: Lamming, G.E. **Marshall's Physiology of Reproduction**. 4^a ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990, p.382-384.
- BETINI, C.M., MORAES, G.V., RIGOLON, L.P. Inseminação artificial de cadelas com sêmen fresco diluído em meios formulados com água de coco e leite em pó desnatado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.25, p.373-375, 2001.

- BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R.S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility, **Theriogenology**, v.34, p.147-157, 1990.
- BOUCHER, J., FOOTE, R.H., KIRK, R.W. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. **Cornell Vet.**, v.48, p.67-86, 1958.
- BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. *et al.* Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães – Efeito do meio diluidor. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v.53, p.364-371, 2001.
- BURGESS, C.M., BREDL, J.C.S., PLUMMER, J.M., ENGLAND, G.C.W. 2001. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 57, p.357-363, 2001.
- BURGOS, M.H., VITALE-CALPE, R., AOKI, A. Fine structure of the testis and its functional significance. In: JOHNSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. **The testis – Development, anatomy and physiology**. New York: Academic Press Inc. 1970, p.551-649.
- BURKE, T.J. **Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment**, Philadelphia: Ed. Lea & Febiger, 1986.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R; UCHOA, D.C. *et al.* Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v.59, p.743-751, 2003.
- CHAN, P.J., TREWDAY, D.R., CORSELI, J., PANG, S., SU, B.C. Combined supravital staining and hyposmotic swelling. **Hum Reprod**, v.6, p.1115-1118, 1991.
- CHIRINÉA, V.H. **Efeito do meio de congelação sobre as características morfo-funcionais do sêmen canino**. Botucatu, 2004, 56p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista.
- CHIRINÉA, V.H., MARTINS, M.I.M., SOUZA, F.F., TEBET, J.M., PAPA, F.O., LOPES, M.D, Structural changes of canine sperm submitted to freezing process. **In: Proc.16th Cong. Bras. Reprod. Anim. Brazil**, p.1, 2005.
- CHOULDHRY, T.M., BERGER, T., DALLY, M. In vitro fertility evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative in vivo fertility. **Theriogenology**, v.43. p.1195-1200, 1995.
- CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Editora Manole, 1988.
- COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. **J. Reprod. Fertil.**, v.42, p. 277-285, 1975.

- COLENBRANDER, B., GADELLA, B.M., STOUT, T.A.E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reprod Dom Anim**, v.38, p.305-311, 2003;
- CONCANNON, P.W., BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK R.W. (Ed), **Current veterinary therapy**. Philadelphia: WB Saunders, p. 1247-1259. 1989.
- CONCANNON, P.W., HANSEL, W., MCENTEE, K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. **Biol Reprod**, v.17, p.604-613, 1977.
- CONCANNON, P.W., McCANN, J.P., TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J. Reprod. Fertil.**, Supp. 39, p.3-25, 1989.
- CUNHA, I.C.N. **Criopreservação do sêmen de cães**. Botucatu, 2002, 149p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista.
- CUNHA, I.C.N., LOPES, M.D. Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluidores à base de leite e glicina gema. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, 1997.
- CUNHA, I.C.N., LOPES, M.D., ZUCCARI, C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para a avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. **In: Proc XV Cong Panam Ci Vet Brasil**, v.1, p.411, 1996.
- CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Rev. Reprod.** v. 5, p. 46-52, 2000.
- DAHLBON, 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.
- DAURIO, C.P., GILMAN, M.R., PULLIAM, J.D., SEWARD, R.L. Evaluation of male Beagles and safety of ivermectin. **Am. J. Vet. Res.** v.48, p.1755-1760, 1987.
- DAVIS, I.S., BRATTON, R.W., FOOTE, R.H. Livability of bovine spermatozoa at 50, -25 e -85°C in Tris-buffered and citrate-buffered yolk glycerol extenders. **J. Dairy Sci.** v.46, p.333-336, 1963.
- DE LOS REYES, M., CARRION, M., BARROS, C. In vitro fertilization of in vitro matured canine oocytes using frozen-thawed dog semen. In: **Proc 5th Int Symp Canine Feline Reprod Brazil**, v.1, p.194-195, 2004.
- DE LEEUW, F.E., CHEN, H.C., COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A. Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v.27, p.171-183, 1990.

- DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1980, 446p.
- DONELLY, E.T., LEWIS, S.E.M., MCNALLY, J.A., THOMPSON, W. In vitro fertilization and pregnancy rates: The influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. **Fertil Steril**, v. 70, p.305-314, 1998.
- DOTT, H.M., FOSTER, G.C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a different “live/dead” stain. **J. Reprod. Fertil.**, v.29, p.443-445.
- EILTS, B.E. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. **Theriogenology**, v.64, p.685-691, 2005.
- ELLINGTON, J.; SCARLETT, J.; MEYERS-WALLEN, V.; MOHAMMED, H.O.; SURMAN, V. Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. **Theriogenology**, v.40, p.725–733, 1993.
- ENGLAND, G. C. W., PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v.46, p.165-171, 1996.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 47, p. 243 -255, 1993.
- ENGLAND, G.C.W. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. **Theriogenology**, v.52, p.981-986, 1999.
- ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Crystallization patterns in anterior vaginal fluid from bitches in oestrus. **J. Reprod. Fertil.**, v.86, p.335-339, 1989.
- ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II: Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v.37, p.373 – 381, 1992.
- ENGLAND, G.C.W., PLUMMER, J.M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 47, p. 261-270, 1993.
- FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v.53, p.175-186, 2000.
- FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.42, p.251-260, 1996.
- FARSTAD, W.; ANDERSEN-BERG, K. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. **J. Reprod. Fertil.** v. 39, p. 289-292, 1989.
- FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction** Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996.
- FERGUSON, J.M., RENTON, J.P., FARSTAD, W., DOUGLAS, T.A. Insemination of beagle bitches with frozen semen. **J. Reprod. Fertil.** Suppl. 39, p.293-298, 1989.

- FONTBONNE, A., BADINAND, F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 47, p.325-327, 1993a.
- FONTBONNE, A., BADINAND, F. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 47, p.531-532, 1993b.
- FONTBONNE, A., REYNAUD, K., MARSELOO, N., DUMASY, M., CHASTANT-MAILLARD, S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **In: Proc 5th Int Symp Canine Feline Reprod Brazil**, v.1, p.144-145, 2004.
- FONTENELLE, P.S., CARDOSO, J.F.S., CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Conservação a 5 °C do sêmen canino diluído em água de coco. **Ci. Anim.** v. 12, p.153-156, 2002.
- FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. **Am. J. Vet. Res.**, v. 25, p. 37 – 40. 1964.
- FOOTE, R.H., BREDDERMAN, P.J. Sizing of aging bull spermatozoa with an electronic counter. **J. Dairy Sci.** v.52, p.117-120, 1969.
- FOOTE, R.H., SWIERSTRA, E.E., HUNT, W.L. Spermatogenesis in the dog. **Anat. Rec.** v.173, p.341-351, 1972.
- FOOTE, R. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present and future. **J. Androl.** v.3, p.85-100, 1982:
- FOUGNER, J.A. Artificial insemination in fox breeding. **J. Reprod. Fertil.** Suppl. 39, p.317-323, 1989.
- FOUGNER, J.A., AAMDAL, J., ANDERSEN, K. Intrauterine insemination with frozen semen in the blue fox. **Nord. Vet. Med.** v.25, p.144-149, 1973.
- FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** v.49, p.277-284, 1977.
- FROMAN, D.P., AMANN, R.P., RIEK, P.M., OLAR, T.T. Acrosin activity of canine spermatozoa as a an index of cellular damage. **J. Reprod. Fertil.** v.70, p.301-308, 1984.
- GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A., PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biol. Reprod.** v.34, p.127-138, 1986.
- GAO, G.Y., ASHWORTH, E., WATSON, P.F., KLEINHANS, F.W., MAZUR, P., CRITSER, J.K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. **Biol. Reprod.** v.49, p.112-123, 1993.

- GETTY, R. Anatomia dos animais domésticos. Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, 5ª ed., 2, 1981, 2000p.
- GIL MA, ROCA J, CREMADES T, HERNANDÉZ M, VÁZQUEZ JM, RODRÍGUEZ-MARTINEZ H, MARTINEZ EA. Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates? **Theriogenology** v.64, p.305-16, 2005,
- 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.
- GILL, H.P., KANFRAN, C.F., FOOTE, R.F., KIRK, R.W. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. **Am. J. Vet. Res.** v.31, p.1807-1813, 1970.
- GOODROWE, K.L.; HAY, M.A.; PLATZ, C.C. *et al.* Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v.53, p.299-308, 1998.
- GOODWIN, M., GOODING, K.M., REGNIER, F. Sex pheromone in the dog. **Science**, v.203, p. 559-561, 1979.
- GOVETTE, G., LINDE-FORSBERG, C., STRÖM, B. A successful concept for freezing of dog semen. In: Proc. **13TH International Congress for Animal Reproduction** v. 2, p.5-8, 1996.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet. Clin. North. Am.: Equine Practice** v.12, p.131-147, 1996.
- GRAHAN, J.K., FOOTE, R.H. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v.24, p.42-52, 1987.
- GRANDJEAN, D, VAISSAIRE, J.J. **Enciclopédia do cão Royal Canin**. 1ª ed. Paris: Ed. Aniwa. 2001, 635p.
- GUÉRIN, C. A inseminação artificial na espécie canina. **A Hora Vet.** v.105, p.25-32, 1998.
- GUNZEL-APEL AR, GUNTHER C, TERHAER P, BADER H. Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. **J Reprod Fertil Suppl.**47, p.271-278, 1993.
- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Ed. Manole Ltda., 6ª ed., 1995.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.** v.11, p.73-88, 1990.
- HARROP, A.E. Some observations on canine semen. **Vet. Rec.** v.67, p.494-498, 1955.

- HARROP, A.E. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. **Vet. Rec.** v.110, p.194-196, 1954.
- HARROP, A.E. Artificial insemination in the dog. In: MAULE, P.T. (ed) **The Semen of Animals and Artificial Insemination**. Farnham Royal, UK: Commonwealth Agricultural Bureau. 1962, p. 304-315.
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** v.88, p.343-352, 1990.
- HASE, M.; HORI, T., KAWAKAMI, E., TSUTSUI, T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis systems in dogs. **J. Vet. Med. Sci.** v.62, p.243-248, 2000.
- HAY, M.A., KING, W.A., GARTLEY, C.J., LEIBO, S.P., GOODROWE, K.L. Canine spermatozoa – cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology** v.48, p.1329-1342, 1997.
- HAY, M.A., GOODROWE, K.L. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. **J Reprod Fertil Suppl** 47, p.297-305, 1993.
- HENAULT, M.A., KILLIAN, G.J. Effects of sperm preparation and bull fertility on in vitro penetration of zona-free bovine oocytes. **Theriogenology**, v.43, p.739-749, 1995.
- HERMANN, H.A.; SWANSON, E.W. Variations in dairy bull semen with respect to its use in artificial insemination. **Univ. Mo. Agr. Exp. Sta. Bull.** 326 p. 1941.
- HERRERA, C., BROGLIATTI, G., CAVIA, R., CONDE, P., REVORA, M., PASQUALINI, R.S. CASA sperm parameters and their relation with in vitro fertilization. **In. Proc. 15th Int. Cong. Anim. Reprod. Brazil**, p.411, 2004.
- HEWITT DA, ENGLAND GCW. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. **Anim Reprod Sci**, v. 50, p.123-139, 1997.
- HEWITT DA, FLETCHER S, ENGLAND GCW. Test of canine sperm function in vitro using primary homologous oocytes with fluorescence and confocal microscopy. **J Reprod Fertil Suppl.** 57, p.127-136, 2001.
- HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C.W. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. **Anim. Reprod. Sci.** v.51, p.321-332, 1998.
- HEYWOOD, R., SORTWELL, R.J. Semen evaluation in the beagle dog. **J Small Anim Pract** v.12, p.343-346, 1971.

- HIRANO, Y., SHIBAHARA, H., OBARA, H., SUZUKI, T., TAKAMIZAWA, S., YAMAGUCHI, C., TSUNODA, H., SATO, I. Relationship between sperm motility characteristics assessed by computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. **J. Assist. Reprod. Genet.** v. 18, p.213-218, 2001.
- HOLST, P. A., PHEMISTER, R. D. The prenatal development of the dog: preimplantation events. **Biol. Reprod.** v.5, p.194 – 206, 1971.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.
- IGUER-OUADA M, VERSTEGEN JP. Evaluation of the “Hamilton Thorn Computer-Based Automated System” for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.733-749, 2001.
- IGUER-OUADA, M. **Medically assisted procreation in Canine Species: Analyses and 4 °C preservation of semen.** Liège, 2001. 219p. Tese (Doutorado) - Université de Liège.
- INAMASSU, A., UECHI, E., LOPES, M.D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.302-304, 1999.
- IVANOVA-KICHEVA, M. G., SUBEV, M. S., BOBADOV, N. D., DACHEVA, D. P., ROUSEVA, I. A. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa, **Theriogenology**, v.44, p.563-569, 1995.
- 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.1343-1349, 1997.
- IVANOVA, M., MOLLOVA, M., IVANOVA-KICHEVA, M.G., PETROV, M., DJARKOVA, T.S., SOMLEV, B. Effect of cryopreservation on zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. **Theriogenology**. v. 52, p. 153 – 170, 1999.
- ISHIBASHI, K., KUWANHARA, M., GU, Y., KAGEYAMA, Y., TOHSAKA, A., SUSUKI, F., MARUMO, F., SASAKI, S., Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 782-786, 1997.
- JANUSKAUSKAS, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm viability by measurements of ATP, membrane integrity and motility in frozen thawed bull semen. **Acta Vet. Scan.** v. 36, p. 571 – 574, 1995.
- JEDRZEJCZAK, P., PAWELCZYK, L., TASZAREK-HAUKE, G., KOTWICKA, M., WARCHOL, W., KURPISZ, Z. Predictive value of selected sperm parameters for classical in vitro fertilization procedure of oocyte fertilization. **Andrologia** p.72-82, 2005.

- JEULIN, C., FENEUX, D., SERRES, C., JOUANNET, P., GUILLET-ROSSO, F., BELLAISH-ALART, J. *et al.* Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization. **J. Reprod. Fertil.** v.76, p.735-744, 1986.
- JEYEDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., ZANEVELD, L.J.D. The hypoosmotic swelling test: An update. **Arch. Androl.** v.29, p.105-116, 1992.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline theriogenology.** Philadelphia: W.B.Saunders, 2001. 592p.
- JOHNSTON, L.A., LACY, R.C. Genome resource banking for species conservation: selection of sperm donors. **Cryobiology**, v.32, p.68-77, 1995.
- KALLET, R.H., JASMER, R.M., LUCE, J.M., LIN, L.H., MARKS, J.D. The treatment of acidosis in acute lung injury with Tris-Hydroxymethyl-Aminomethane (THAM). **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.** v.161, p.1149-1153, 2000.
- KAWAKAMI, E., TSUTSUI, T., OGASA, A. Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity. **J. Vet. Med. Sci.** v.53, p.241-248, 1991.
- KAWAKAMI, E., VANDEVOORT, C.A., MAHI-BROWN, C.A., OVERSTREET, J.W., Induction of acrosome reaction of canine spermatozoa by homologous zona pellucida. **Biol. Reprod.** v.48, p.841-845, 1993.
- KIM, Y.J., PARK, Y.J., KIM, B.J., YU, I.J. Artificial insemination with frozen semen in the dog – simple freezing method using methanol. **Korean J. Vet. Res.**, v.34, p.851-855, 1994.
- KIRK, E.S., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K. Comparison of in vitro laboratory analysis with the fertility of cryopreserved stallion sperm. **Theriogenology**, v.64, p.1422-1439, 2005.
- KOJIMA, Y., KAWAKAMI, W., SHINO, M., OHCHI, T. A small trial on a new insemination technique with fresh dog semen using the artificial penis. **J. Reprod. Dev.** v.42, p.39-41, 1996a.
- KOJIMA, Y., KAWAKAMI, W., SHINO, M., OHCHI, T. Preliminary test of artificial insemination in the dog – intrauterine transportation of liquid using the artificial penis. **J. Reprod. Dev.** v.42, p.35-38, 1996b.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, p.1279-1289, 1993.
- LARSSON, B., EINARSSON, S. Influence of thawing diluents on vitality, acrosome morphology, ultrastructure and enzyme release of deep frozen boar spermatozoa. **Acta. Vet. Scan.** v. 17, p. 83 – 100, 1976.
- LARSSON, B., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization to predict semen fertility? **Anim. Reprod. Sci.** v.60-61, p.327-336, 2000.

- LINDE – FORSBERG, C., FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. **J. Reprod. Fertil.** Suppl.39, p.299-310. 1989.
- LINDE-FORSBERG, C., STRÖM, H.B., GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. **Theriogenology**, v.52, n.1, p.11-23, 1999.
- LINDE, C. Transport of radiopaque fluid into the uterus after vaginal deposition in the oestrous bitch. **Acta Vet. Scand.** v.19, p.463-465, 1978.
- LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. **Vet. Clin. N. Am: Small Anim. Pract.** v.21, p.467-485, 1991.
- LINDSAY, F.E.F. The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy. **J. Small Anim. Pract.**, v.24, p.1-15, 1983.
- LOVELOCK, J.E., POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Byochem. J.** v.58, p.318-322, 1954.
- MAHADEVAN, M.M., TROUNSON, A.O. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. **Fertil. Steril.** v.41 (2), p.287-293, 1984.
- MAHI, C.A., YANAGIMACHI, R. Maturation and sperm penetration of canine oocytes in vitro. **J. Exp. Zoo**, v.196, p.189-196, 1976.
- MANN, T. **The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.** London: Methuen and Co.1964, 493p.
- MARTIN, I.C.A. 1963. The deep freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim milk. **Res. Vet. Sci.**, v. 4, p. 315 – 325.
- MARTINS, M.I.M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães.** Botucatu, 123p, 2005. – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- MASTROMONACO, G.F., HAY, M.A., GOODROWE, K.L. The effect of oocyte storage and Cumulus cell presence on canine zona penetration by domestic dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1123-1134, 2002.
- MAYENCO-AGUIRRE, A.M., PÉREZ-CORTÉS, A.B. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.50, p.195-204, 1998.
- McLAUGHIN, E.A.; FORD, W.C.L.; HULL, M.G.R. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg-yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. **J. Reprod. Fertil.** v.95, p. 749 – 754, 1992.

- McPHAIL, D.B., GOODMAN, B.A. Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems. **Bioch. J.** v.221, p.559-560, 1984.
- METCALF, S. **Assisted reproduction in the bitch**. Australia, 1999, 161p. Thesis (Master of Sciences) - Institute of Reproduction and Development, Faculty of Science, Monash University.
- MIALOT, J.P., DUMON, C., CASSOU, B. Insémination artificielle chez la chienne: Mise en place de semence fraîche avec le pistolet souple "Osiris". **Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.** v.20, p. 213-220, 1985.
- MIALOT, J.P., GUERIN, C., BEGON, D. Growth, testicular development and sperm output in the dog from birth to post pubertal period. **Andrologia.** v.17, p.450-460, 1985a.
- MOURA, C.S. **Utilização de diferentes diluentes na criopreservação do sêmen de cão**. 2000. 40p. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- MOUSSA, M., MARTINET, V., TRIMECHE, A., TAINTURIER, D., ANTON, M. Low density lipoproteins extract from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, 1695-1706, 2002.
- MOREY, D.E. The early evolution of the domestic dog. **Amer. Sci.** v.82, p.336-347, 1994.
- MORTON, D.B., BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **J. Reprod. Fertil.** v.39, p.311-316, 1989.
- NELSON, D.L., COX, M.M.. **Lehninger principles of biochemistry**. 3rd ed. Freeman & Company. 2000, 1200p.
- NOTHLING, J.O., GERSTENBERG, C., VOLKMAN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – a retrospective study. **J. South. Afr. Vet. Assoc.** v.66, p.49-55, 1995.
- NOTHLING, J.O., GERSTENBERG, C., VOLKMANN, D.H. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh quality in dogs. **J. Reprod. Fertil.** v.51, p.109-116, 1997.
- NOTHLING, 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.
- NÖTHLING, J.O., VOLKMANN, D.H. Effects of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 47, p.335-341, 1993.
- NUNES, J.F., CIRÍACO, A. L. T., SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. Fortaleza: Gráfica LCR, 1997, 199 p.

- OEHNINGER, S., MAHONY, M.C., SWANSON, J.R., HODGEN, G.D. The specificity of human spermatozoa/zona pellucida interaction under hemi-zona assay conditions. **Mol. Reprod. Dev.** v. 35, p. 57 – 61, 1993.
- OEHNINGER, S., FRANKEN, D.R., SAYED, E., BARROSO, G., KOLM, P. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. **Hum Reprod Update**, v.6, p.160-168, 2000.
- OETTLÉ, E.E. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. **Anim. Reprod. Sci.** v.12, p.145-150, 1986.
- OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 47, p.257-260, 1993.
- OETTLÉ, E.E.; SOLEY, J.T. Infertility in a malttese poodle as a result of a sperm midpiece defect. **J. South Afr. Vet. Assoc.** v.56, p.103-106, 1985.
- OKANO, T., MURASE, T., ASANO, M., TSUBOTA, T. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. **J. Vet. Med. Sci.** v.66, p.1359-1364, 2004.
- OLAR, T.T., AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. **Biol. Reprod.** v.29, p.1114-1120, 1983.
- OLAR, T.T. **Cryopreservation of dog spermatozoa.** Colorado, 1984. Tese de Doutorado - Colorado State University.
- OLAR, T.T., BOWEN, R.A., PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v.31, p.451-461, 1989.
- OLIVEIRA, E.C.S. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino.** Belo Horizonte, 2003, 61p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais.
- OTOI, T., MURAKAMI, M., FUJII, M., TANAKA, M., OOKA, A., UNE, S., SUZUKI, T. Development of canine oocytes matured and fertilized in vitro. **Vet. Rec.** 146: 52 – 53, 2000.
- PARKS, E.J., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology** v.38, p.209-222, 1992.
- PEÑA, A.I. Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity. Uppsala, 86p, 2000. Tese (Doutorado) - Swedish University of Agriculture Sciences.

- PEÑA, A., LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.703-718, 2000a.
- PEÑA, A., LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. ***Theriogenology***, v.54, p.859-875, 2000b.
- 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-MARTINEZ, I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. ***Anim Reprod Sci***, v.82-83, p.209-224, 2004.
- PEREIRA, B.S., SILVA, A.R., UCHOA, D.C., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Comparação da monta natural e inseminação artificial com sêmen diluído em água de coco em cadelas da raça Boxer. ***Ci. Anim.*** v.11, p.97-100, 2001.
- PEREZ-LLANO, B., LORENZO, J.L., YENES, P., TREJO, A., GARCIA-CASADO, P. A short hyposmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. ***Theriogenology*** v.56, p.387-398, 2001.
- PÉREZ-PÉ, R.; CÉBRIAN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. ***Theriogenology***, v.56, p.425-434, 2001.
- PHELPS, M.J., LIU, J., BENSON, J.D., WILLOUGHBY, C.E., GILMORE, J.A., CRITSER, J.K. Effect of Percoll separation, cryoprotective agents and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance for cryopreservation. ***Biol. Reprod.*** v.61, p.10312-1041, 1999.
- PINEDA, M.H., KAINER, R.A., FAULKNER, L.C. Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. ***Am. J. Vet. Res.*** v.34, p.1487-1491, 1973.
- PINTO, C.R.F., EILTS, B.E., PACCAMONTI, D.L. The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. ***Theriogenology***, v.50, p.301-305, 1998.
- PINTO, C.R.F., PACCAMONTI, D.L., EILTS, B.E. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. ***Theriogenology***, v.52, p.609-616, 1999.
- PLATZ, C.C., SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. ***Lab. Anim. Sci.*** v.27, p.1013 – 1016, 1977.
- PLUMMER, J.M.; WATSON, P.F.; ALLEN, W.E. A spermatozoal midpiece abnormality associated with infertility in a Lhasa Apso dog. ***J. Small Anim. Prac.*** v.28, p.743-751, 1987.

- POLGE, C., SMITH, A.U., PARKERS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, v.164, p.166, 1949.
- PROVINCE, C.A., AMANN, R.P., PICKETT, B.W., SQUIRES, E.L. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**, v.22, p.409-415, 1984.
- QUINTELA, A.T., GUSMÃO, A.L., LOPES, M.D., SILVA, J.C., ALVARENGA, M.A., RESENDE, J., MENEZES, M., PORTELA, A.P., ALMEIDA, A.K. Hyposmotic test with distilled water to evaluate sperm plasma membrane integrity of dog semen – preliminary data. **In. Proc. 15th Int. Cong. Anim. Reprod. Brazil**, p.518, 2004.
- QUINTERO-MORENO A, RIGAU T, RODRIGUEZ-GIL JE. Regression analysis and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Theriogenology**, v.61, p.673-690, 2004.
- QUINTERO-MORENO, A., MADRIGAL, O., GALLARDO, F., LOBO, V., MEDRANO, A., PEÑA, A., MIRÓ, J., RIGAU, T., RODRIGUEZ-GIL, J.E. Sperm subpopulation with specific motility characteristics in mammalian ejaculates. **In. Proc. 15th Int. Cong. Anim. Reprod. Brazil**, p.227, 2004.
- RAO, B., SOUFIR, J.C., MARTIN, M., DAVID, G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. **Gamete Res.** v.24, p.127-34, 1989.
- RAVASZOVA, O., MESAROS, P., CINGAKOVA, V., LUKACINOVA, M. A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage. **Folia Vet.** v.40, p.95-99, 1996.
- RENTON, J.P.; HARVEY, M.J.A.; HARKER, S. A spermatozoal abnormality in dogs related to infertility. **Vet. Rec.** v.118, p.429-430, 1986.
- REVEL, S.G., MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Anim. Reprod. Sci.** v.36, p.77-86, 1994.
- RIGAU, T., FARRÉ, M., BALLESTER, J., MOGAS, T., PEÑA, A., RODRIGUEZ-GIL, J.E. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. **Theriogenology**, v.56, p.815-829, 2001.
- RIGAU, T., RIVERA, M., PALOMO, M.J., FERNANDEZ-NOVELL, J.M., MOGAS, T., BALLESTER, J., PEÑA, A., OTAEGUI, P.J., GUINOVART, J.J., RODRIGUEZ-GIL, J.E. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. **Reproduction**, v.123, p.579-591, 2002.
- RIJSSELAERE, T., VAN-SOOM, A., MAES, D., KRUIF, A. Use of Sperm Quality Analyzer II (SQA II) for the assessment of dog sperm quality. **Reprod.Dom. Anim.** v.37, p.158-163, 2002.

- RIJSSELAERE, T., VAN-SOOM, A., HOFACK, G., MAES, D., KRUIF, A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, v.62, p.1292-1306, 2004.
- RIJSSELAERE, T., VAN-SOOM, A., TANGHE, S., CORYN, M. MAES, D., de KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. **Theriogenology**, v.64, p.706-719, 2005.
- RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado**. Porto Alegre, 1997. 176p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- RODRIGUES, B.A., DOS SANTOS, L.C., RODRIGUES, J.L. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. **Mol Reprod Dev**, v.67, p.215–223, 2004.
- RODRIGUES-MARTINEZ, H., EKWALL, H., LINDE-FORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47, p.279-285, 1993.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. **In: Proc 16º Cong Bras Reprod Anim Brazil**, v.1, p.1-9, 2005.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., EKWALL, H. Quantitative energy x-ray microanalysis in biopsies of porcine myometrium after cryo-fixation. *J. Ultrastruc. Mol. Struc. Res.* v.102, p.299, 1989.
- ROTA A, PEÑA AI, LINDE-FORSBERG C, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlorthetracycline assay and changes in motility patterns. **Anim Reprod Sci**, v.57, p.199-215, 1999.
- ROTA, A. **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa**. Upsala, 1998. Doctoral Thesis – Swedish University of Agricultural Sciences.
- ROTA, A., IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J., LINDE-FORSBERG, C. Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. **Theriogenology**, v.51, p.1045-1058, 1999.
- ROTA, A., ROTA, A., MARTINE, M., MILANI, C., ROMAGNOLI, S. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. **Reprod. Nutr. Dev.** v.45, p.29-37, 2005.
- ROTA, A., STROM, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects 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.

- ROTA, A., FRISHLING, A., VANNOZI, I., CAMILLO, F., ROMAGNOLI, S. Effect of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 57, p.377-381, 2001.
- SANCHEZ, R., RISOPATRÓN, J., SEPULVEDA, G., PENA, P., MISKA, W. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa: effects of proteinase inhibitors. **Theriogenology**, v.43, p.761-768, 1995.
- SANCHEZ, A., RUBILAR, J., GATICA, R. Uso de la prueba hipoosmótica em la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. **Arch. Med. Vet.** v.34, p.131-134, 2002.
- SANCHEZ-PARTIDA, L.G.; WINDSOR, D.P.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen **J. Androl.** v.20, p.280-288, 1999.
- SANTOS, S.E.C., VANNUCCHI, C.I., SATZINGER, S., VISINTIN, J.A. Comparação de dois crioprotectores na congelação de sêmen de cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.25, p.472-473, 2001.
- SANTOS, I.W. **Albumina sérica bovina como fonte protéica do diluidor Tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino.** Jaboticabal, 2004. 63p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista.
- SAS INSTITUTE INC. **Statview Version 5.0: Statview Reference.** Cary: SAS Institute Inc., 1998, 528p.
- SCHUTTE, A.P. Canine Vaginal Citology-II. Cyclic Changes. **J. Small. Anim. Pract.** v.8, p.307-311, 1967.
- SEAGER, S. W. J., PLATZ, C. C. Artificial insemination and frozen semen in the dog. **Vet. Clin. North Anim.** v.7, p.757-764, 1977.
- SEAGER, S.W.J. Artificial insemination in dogs. In: Burke, T.J. (Ed). **Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment,** Philadelphia: Lea & Febiger, p. 207-217, 1986.
- SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. **A. I. Dig.** p.17-26, 1969.
- SEAGER, S.W.J., FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Lab. Anim. Sci.** v.22, p.177-182, 1972.
- SENDROY JR., J., RODKEY, F.L., MACKENZIE, M. Use of Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer in moving boundary electrophoresis of serum. **Clin. Chem** v.8, p.582-592, 1962.

- SHIN, N.S., MOON, Y.S., CHUNG, D.H., KIM, Y. Artificial insemination with frozen canine semen using vaginal endoscope. **Korean J. Vet. Clin. Med.** v.14, p.297-300, 1997.
- SILVA, A.R. **Otimização de uma metodologia para a congelação do sêmen canino diluído em tampão Tris.** Fortaleza, 66p. 2001. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará.
- SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Efeito do processo de descongelação sobre a viabilidade do sêmen canino in vitro. **Ci. Anim.** v.8, p.75-80, 1998.
- SILVA AR, CARDOSO RCS, SILVA LDM. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. **Reprod. Dom. Anim.** *In press.*
- SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. **Ci. Rur.** v.6, p.1021-1025, 2000.
- 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: **Anais do X Ciclo de Atualização em Medicina Veterinária da UDESC**, Lages 2001, p. 112-113.
- SILVA, A.R., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Uso da sonda de Osiris na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Rottweiler. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.5, p.147-149, 2002a.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **The Vet. J.**, v.164, p.244-246, 2002c.
- SILVA, A.R., CARDOSO, R.C., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Canine semen cryopreservation with different glycerol concentrations. **Rev. Bras. Ci. Vet.**, v.9, p.25-28, 2002d.
- 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.; MORATO, R.G.; SILVA, L.D.M. The potential of gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Anim. Reprod. Sci.**, v.81, p.159-175, 2004.
- SILVA AR, CARDOSO RCS, SILVA LDM. Comparison between powder coconut water (PCW 106[®]) and Tris-buffer as extenders for canine semen cryopreservation. In: **Proc. 5th International Symposium for Canine and Feline Reproduction.** p.98-99, 2004.
- SILVA, L.D.M. Avanços da inseminação artificial na espécie canina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.25, p.107-111, 2001.

- SILVA, L.D.M. **Procréation médicalement assistée dans l'espèce canine. Investigations morpho-fonctionnelles et optimisation des techniques permettant d'arriver à la maîtrise de la reproduction.** Liège, 1995, 173p. Tese (Doutorado) - Université de Liège.
- SILVA, L.D.M., ONCLIN, K., VERSTEGEN, J.P. Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. **Vet. Rad. Ultrasound**, v.37, p.313-320, 1996.
- SILVA, L.D.M., SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S. Inseminação artificial em cães. **In: Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** Eds. P.B.D. GONSALVES, J.R.F. FIGUEIREDO, V.J.F. FREITAS. São Paulo: Ed.Varella, p.69-95, 2002b.
- SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.44:571-579, 1995.
- SIRIEIX, D, DELAYANCE, S., PARIS, M., MASSONNET-CASTEL, S., CARPENTIER, A., BARON, J.F. Tris-hydroxymethyl-aminomethane and sodium bicarbonate to buffer metabolic acidosis in an isolated heart model. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.** v.155, p.957-963, 1997.
- SIRIVAIIDYAPONG, S., CHENG, F.P., MARKS, A., VOORHOUT, W.F., BEVERS, M.M., COLENBRANDER, B. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriogenology**, v.53, p.789-802, 2000.
- SIRIVAIIDYAPONG, S.; URSEN, P.; BEVERS, M.M. *et al.* Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.57, p.383-386, 2001.
- SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A. *et al.* Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ci. Rur.**, v.32, p. 649-655, 2002.
- SOUZA, F.F. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino.** Botucatu, 2003, 97p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista.
- SONGSASSEN, N., YU, I., MURTON, S., PACCAMONTI, D.L., EILTS, B.E., GODKE, R.A., LEIBO, S.P. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. **Cryobiology**, v.44, p.79-90, 2002.
- SPITTALER, P.J.; TYLER, J.P.P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity of the spermatozoal membrane. **Clin Reprod Fertil**, v.3, p.187-190, 1985.
- STORNELLI, M.A., STORNELLI, M.C., ARAUZ, M.S., SAVIGNONE, C.A., GARCÍA, M., DE LA SOTA, R.L. Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado refrigerado a 4°C. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.25, p.468-470, 2001.
- STRÖM, 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.

- STROM-HOLST B, LARSSON B, LINDE-FORSBERG C, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. **J Reprod Fertil**, v.119, p.201-206, 2000.
- SUZUKI, K., NAGAI, T. In vitro fertility and motility characteristics of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa separated by Percoll. **Theriogenology**, v.60, p.1481-94, 2003.
- TAHA, M.B., NOAKES, D.E., ALLEN, W.E. The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. **J. Small Anim. Pract.** v.22, p.177-184, 1981.
- TARDIF, A.L.; FARRELL, P.B.; TROUERN-TREND, V.; SIMKIN, M.E.; FOOTE, R.H. Use of Hoechst 33324 stain to evaluate live fresh and frozen bull sperm by computer assisted analysis. **J. Androl.** v.19, p.201-206, 1998.
- TARTAGLIONE, C.M., RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004.
- THURSTON, L.M., SIGGINS, K., MILEHAM, A.J., WATSON, P.F., HOLT, W.V. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. **Biol. Reprod.** v.66, p.545-554, 2002.
- TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **J. Reprod. Fertil.** Suppl. 39, p.269-275, 1989.
- TSUTSUI, T., HASE, M., TANAKA, A., FUJIMURA, N., HORI, T., KAVAKAMI, E. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk Tris-fructose citrate. **J. Vet. Med. Sci.** v.62, p.603-606, 2000.
- TSUTSUI, T.; HASE, M.; HORI, T. *et al.* Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.537-538, 2000.
- TSUTSUI, T.; KAWAKAMI, E. MURAO, I. OGASA, A. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. **J. J. Vet. Sci.**, v.51, p.560-565, 1989.
- UCHOA, D.C., SILVA, A.R., SILVA, T.F.P., SILVA, L.D.M. Inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Bassethound utilizando a Sonda de Osíris[®]. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.25, p.371-373, 2001.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. *et al.* Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**. v.28, p.709-723, 1987.

- VAN DER VEN, H.H., JEYENDRAN, R.S., AL-HASANI, S., PEREZ-PELAEZ, M., DIEDRICH, K., ZANEVELD, J.D. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. **J. Androl.** v.7, p.190-196, 1986.
- VARELLA JR., A.S., LUCIA, T., CORRÊA, M.N., ALVARENGA, M.V.F., BIANCHI, I., ULGUIM, R.R., ROSA, A.P., CORCINI, C.D., DESCHAMPS, J.C. Effect of low density lipoproteins from hen egg yolk on the quality of canine semen cooled at 5°C. **In. Proc. 15th Int. Cong. Anim. Reprod. Brazil**, p.514, 2004.
- VASKE, T. R., MORAES, H. F., ROMÃO, A.R., BLASI, A.C., PERASSI, P., AUN, G.C. Seis cães normais nascidos de sêmen congelado. **A Hora Veterinária**, v.1, p.15 – 18, 1981.
- VERSTEGEN, J.P., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in adrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.
- 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.
- VILLA, R.A., FERNANDES, M.B., ACCORSI, M.F., GALERANI, M.A., LÔBO, R.B. Avaliação da fertilidade in vitro do sêmen congelado de touros da raça Caracu. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.25, p.390-392, 2001.
- WALES, R.G.; WHITE, I.G. Viability of diluted dog spermatozoa in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v.5, p.67-76, 1963.
- WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. **Oxford Rev. Reprod. Biol.** v.1, p.183-350, 1979.
- WATSON, P.F, Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil Dev.** v.7, p.871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.** v.60-61, p.481-492, 2000.
- WATSON, P.F., PLUMMER, J.M. The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. **In: Proc. 1st Int. Conf. Deep. Freez. Boar Semen** p.113-117, 1985.
- WAYNE, R.K., VILA, C. Phylogeny and origin of the domestic dog. In: **The genetics of the dog**, Eds. A. RUVINSKY, J., SAMPSON, CAB International. p. 1-13, 2001.
- WIKIPEDIA. http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_c%C3%ADtrico. Documento recuperado em 07 de outubro de 2005.

- WILSON, M.S. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 47, p.307-311, 1993.
- WOODALL, P.F., JOHNSTONE, I.P. Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog. **J. Reprod. Fertil.** v.82, p.603-609, 1988.
- YAMADA, S., SHIMAZU, Y., KAWAH, H., NAKAZAWA, M., NAITO, K., TOYODA, Y. Maturation, fertilization and development of dog oocytes in vitro. **Biol. Reprod.** v.46, p.853-858, 1992.
- YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M. *et al.* Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v.54, p.579-585, 2000.
- YU, I.; SONGSANSSEN, N.; GODKE, R.A. *et al* Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. **Cryobiology**, v.44, p.62-78, 2002.

ANEXOS

ANEXO 01

Procedimento para Teste de Interação entre Espermatozóides e Oócitos

1. Ovários

- a. Transportar os ovários em solução salina fisiológica (250 mL) a 38°C para o laboratório. Colocar Gentamicina (6,25mg) apenas se o início do procedimento for demorar.
- b. Dissecar os ovários, limpar toda a gordura circundante e lavá-los em solução fisiológica.
- c. Repassar os ovários para uma placa de Petri (60x10) e fatiá-los utilizando lâmina de Bisturi, em uma solução de PBS + 0,4% BSA.
- d. Examinar os oócitos em Lupa, contar o número de oócitos por ovário e selecionar os oócitos Grau 1.
- e. Repassar os oócitos selecionados para uma placa contendo Talp FIV (1h em estufa) ou “PBS + BSA”.
- f. Lavar em Talp FIV ou PBS.
- g. Em uma placa pequena, colocar três gotas de 30? L de Talp FIV, tendo o cuidado pra não colocar as gotas no canto da placa
- h. Colocar aproximadamente 3mL de óleo mineral ao redor das gotas, vagarosamente. Quando for retirar o óleo do seu recipiente, ter o cuidado de não introduzir a ponteira até o final, para não pegar solução salina.
- i. Completar cada uma das três gotas com mais 65? L de Talp FIV.
- j. Colocar 10 oócitos por gota
- k. Cobrir e deixar na estufa até a chegada do sêmen.

2. Sêmen

- a. Descongelar o sêmen e avaliar a motilidade e vigor espermáticos
- b. Centrifugar com Sperm Talp (1h em estufa) na proporção de 1:1 (3400 RPM / 5 min.)
- c. Desprezar o sobrenadante
- d. Calcular o número total de espermatozóides móveis e dividir por 400. O resultado dessa divisão corresponde ao volume de Sperm Talp a ser acrescentado para se atingir a concentração de 400×10^6 sptz móveis/mL.

- e. Homogeneizar com sucessivas pipetagens.
- f. Adicionar 5 µL de sêmen a cada gota com os oócitos, atingindo a concentração final de 2×10^6 spz/mL.
- g. Levar para a lupa para observar a presença dos espermatozóides móveis.
- h. Cobrir a placa com sua tampa e levá-la para a estufa por 18 horas.

3. Avaliação

- a. Retirar a placa da estufa
- b. Avaliar o estado dos oócitos na lupa
- c. Retirar os oócitos e lavá-los 2x em “PBS + BSA”
- d. Retirar os oócitos e transferi-los para um ependorf com solução de citrato de sódio a 1% por dez minutos
- e. Levar o ependorf para o Vortex por 3 minutos
- f. Retirar todo o volume e colocá-lo em uma placa
- g. Coletar os oócitos em um volume mínimo possível e repassá-los para uma lâmina, tendo o cuidado de colocar a pipeta na posição vertical.
- h. Adicionar o corante Hoechst 33258 no mesmo volume, também com a pipeta na vertical, e em seguida, homogeneizar a solução.
- i. Recobrir com uma lamínula, suspensa em vaselina ou silicone em seus cantos, fazendo pressão sobre os mesmos com uma ponteira, para evitar que a gota deslize.
- j. Avaliar em microscópio de epifluorescência.

ANEXO 02

Preparo das Soluções Utilizadas no Teste de Interação entre Espermatozóides e Oócitos**1. Soluções de estoque de íons**

- a. Cloreto de Sódio (NaCl) – 2,28 M
6,665g / 50mL

- b. Cloreto de Potássio (KCl) – 158 mM
0,88g / 50mL

- c. Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃) – 250 mM
1,05g / 50mL

- d. Fosfato de Sódio (NaH₂PO₄H₂O) – 35 mM
0,235g / 50mL

- e. Cloreto de Cálcio (CaCl₂.2H₂O) – 16,46 mM
1,47g / 50mL

- f. Cloreto de Magnésio (MgCl₂.6H₂O) – 10 mM
1,015g / 50mL

- g. Hepes – 1M
1,19g / 5mL

OBS. Utilizar água MiliQ em todas as soluções.

2. Soluções de Estoque TL

a. Espermatozóide TL – Osmolaridade 295 mOsm/L

19,81 mL de H₂O

1,085mL de NaCl

0,49mL de KCl

2,50mL de NaHCO₃

0,25mL de NaH₂PO₄H₂O

0,09mL de Lactato de sódio

0,25mL de Hepes

0,25mL de CaCl₂.2H₂O

0,275mL de MgCl₂.6H₂O

b. FIV TL – Osmolaridade 295 mOsm/L

44,125mL de H₂O

1,25mL de NaCl

0,50mL de KCl

2,50mL de NaHCO₃

2,50mL de NaH₂PO₄H₂O

0,045mL de Lactato de sódio

0,25mL de CaCl₂.2H₂O

0,125mL de MgCl₂.6H₂O

3. Solução TALP

a. TALP SPERM (pH 7,4)

9,5mL Espermatozóiide TL
60mg de BSA (Fração V)
100?L de Piruvato de Sódio (2,2 mg/mL)
83,5?L de Gentamicina (50mg/mL)
10?L de Vermelho Fenol (1mg/100mL)

b. TALP FIV (pH 7,4)

9,5mL de FIV TL
30,0mg de BSA (Fração V)
10?L de Piruvato de Sódio (2,2mg/mL)
83,5?L de Gentamicina (50mg/mL)
10?L de Heparina (2,0mg/mL)
10?L de Vermelho Fenol (1mg/100mL)

ANEXO 03**Preparo das Soluções Utilizadas na Avaliação de Integridade de Membrana Espermática por Microscopia de Fluorescência****1 Solução-Estoque de Fluoresceína**

- | | |
|------------------------------------|--------|
| a. 6-carboxifluoresceína diacetato | 9,2 mg |
| b. DMSO | 20 mL |

2 Solução-Estoque de Iodeto de Propídio

- | | |
|------------------------|-------|
| a. Iodeto de propídio | 10 mg |
| b. Solução fisiológica | 20 mL |

3 Solução de Formaldeído

- | | |
|--|--|
| a. Solução 1:80 de formalina 40%, em solução fisiológica | |
|--|--|

4 Solução de Trabalho

- | | |
|---------------------------------------|---------|
| a. Sol.-Estoque de Fluoresceína | 20 µL |
| b. Sol. Estoque de Iodeto de Propídio | 10 µL |
| c. So. de Formaldeído | 10 µ |
| d. Citrato de Sódio 3% | 0,96 mL |

Obs. A solução de trabalho foi sempre preparada no momento da avaliação microscópica, conforme citado por Cunha, 2002.

ANEXO 04

Convite para participar do prêmio concedido pelo Instituto Royan em Tehran, Iran

De:	"info" <info@royaninstitute.org>  Adicionar endereço
Para:	legio2000@yahoo.com
Assunto:	 The 6th RIRA
Data:	Mon, 29 Nov 2004 10:48:41 +0330

Dear Dr. **Silva**,

Your research paper with the title "**The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids**" in the Animal Reproduction Science Journal, was interesting for Scientific Board of Royan International Research Award.

So, here by we would like to invite you to participate in the 6th Royan International Research Award with the said paper. For participating, you should send us the followings:

1. Your full paper,
2. Filled Application form (is attached)
3. Your CV
4. A color photo of yourself.

If you need more information about our award, please refer to our web site address:

www.RoyanInstitute.org

If the first author can not participate, any of the research colleagues can present the paper if all others accept.

All of our ceremonies and congresses will be held on time if the situation in the middle east is peaceful

Looking forward your early reply

Your Sincerely

S. Kazemi PhD / Award Chairman
Royan Institute
P.O.Box:19395-4644
Tehran - IRAN
Tel: +98 21 241 3790
Fax: +98 21 2409314

ANEXO 05**The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids****O potencial da recuperação de gametas de canídeos e felídeos não domésticos****Animal Reproduction Science,
81: 159-175, 2004**

The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids

Alexandre R. Silva^{a,*}, Ronaldo G. Morato^b, Lúcia D.M. Silva^a

^a Laboratory of Carnivore Reproduction, PPGCV - UECE, Paranjana Ave. 1700, Itaperi,
60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b National Research and Conservation Center for Natural Predators (CENAP/IBAMA),
Pro-Carnivore Association, School of Veterinary Medicine – UNIBAN

Received 20 March 2003; received in revised form 25 September; accepted 2 October 2003

Abstract

Species are becoming extinct at a rate 100 times the natural background rates. Considering all mammalian orders, 24% of all Carnivora species are threatened. The goal of carnivore conservation is to reverse the decline in populations and to secure remaining populations in ways that will assure enduring public support. In this context, biotechnology is a tool with tremendous potential for assisting the conservation of endangered canid and felid species. As the first step for biotechnology development is the gamete obtainment, this review will discuss the potential of gamete recovery from non-domestic canids and felids, based on learning how to apply these procedures in the domestic carnivores. Thus, electroejaculation and obtaining both epididymal spermatozoon and spermatogonial germ cells are indicated as techniques for male gametes recovery. In the female gametes retrieval, different methods for oocyte recovery from both antral and preantral follicles, and the possibility for ovarian tissue transplantation are discussed. Furthermore, the study discusses the responsibilities involved in the use of assisted reproduction in endangered species conservation.

Key-words: conservation, biotechniques, reproduction, canid, felid.

1. Introduction

The constant search for widening territory has led to the destruction and fragmentation of ecosystems. As a consequence, some species have disappeared while some forest islands have been formed. These islands isolate populations and, consequently, prevent the interchange of genetic information, which can lead to the decrease of genetic variability of the involved populations (O'Brien et al., 1985; Roelke et al., 1993). Furthermore, a large number of animals are suffering due to the transformation of their habitats into agricultural centers. It is then that humans systematically eliminate species because they are causing economic damage to farmers. Another consequence is

* **Corresponding Author. Present address:** Rua Aracati, 69, Benfica, Fortaleza, Ceará 60020 – 240, Brazil.
Tel.: + 55-85-2214959; fax: + 55-85-2992740
E-mail address: legio2000@yahoo.com

that a large number of animals have been victims of traffic accidents on roads, increasing the number of convalescent or dead animals (Rodrigues, 2002). Because a great part of these animals belong to endangered species, the loss of a single individual could be deleterious for the maintenance of a species.

Species are becoming extinct at a rate 100 times the natural background rates. With only around 5% of the land surface of the planet protected in some way, continued habitat loss will produce much greater extinction rates, with a potential disappearance of up to half of the world's species. Of all mammalian orders, 24% of all Carnivora species are threatened (Gittleman et al., 2001). Carnivores represent extremes of problems in conservation biology. In one lineage, some canid species such as the red fox (*Vulpes vulpes*) have virtually no risk of extinction – indeed, many now consider them as pests in our largest cities – while other canids such as the Ethiopian wolf (*Canis simensis*) are rapidly proceeding toward inevitable extinction (Purvis et al., 2001). Moreover, among the 37 felid species, only the domestic cat (*Felis catus*) is not in risk of extinction (Pope et al., 1993).

Otherwise, there are many questions concerning the conservation of non-domestic carnivores. Gittleman et al. (2001) classify carnivores as “umbrella species”, since they are predators and require large areas to compound their territory. Thus, if carnivores are conserved, a large number of species and ecosystems will be protected also. Carnivores are also classified as indicator species – those that reflect critical environmental damage; keystone species – those that play a pivotal role in ecosystems; flagship species – popular species that attract much attention; and vulnerable species – species most likely to become extinct.

The goal of carnivore conservation is to reverse declines in populations and to secure remaining populations in ways that will gain enduring public support. In this context, biotechnology has a tremendous potential as a tool for assisting conservation of endangered canids and felids (Wildt, 1997; Bainbridge and Jabbour, 1998; Howard, 1999). Goodrowe et al. (2000) suggest that the Carnivora order has numerous representatives that are imperiled and could benefit from reproductive biotechnology. Due to the phylogenetic similarities between the domestic and non-domestic carnivorous species, the first are used as an experimental model for the others, mainly because of the lack of availability of non-domestic carnivores for use in experiments (Pope et al., 1993). Because the first step for biotechnology development is gamete obtainment, this review will discuss the potential of gamete recovery from non-domestic canids and felids, based on learning how to apply these procedures in the domestic carnivores.

2. Male gamete recovery

2.1 Semen characteristics and storage

Semen is a cellular suspension containing spermatozoa and secretions originating from accessory organs of the masculine reproductive tract. In addition, semen technology refers to the various forms of sperm quality maintenance, including expansion of the seminal volume for fresh use and storage by cooling and cryopreservation. Cryopreservation is an important tool for the formation of cryobanks, as it maintains the sperm viability for an indefinite time. Cryobanks can serve as a source of genetic material to be used through utilizing the reproductive biotechniques in conservation of the non-domestic carnivores. Thus, particular attention will be given to the methods of gamete recovery from canids and felids.

2.2 Electroejaculation

Several methods are reported for semen collection in animals, as the use of an artificial vagina (Jalkanen, 1993), digital masturbation of the penile bulb (Forsberg et al., 1989) and electroejaculation (Watson, 1978; Wildt et al., 1983). With wild carnivores, electroejaculation is the method of choice due to the difficulty and risks involved in handling these animals. Electroejaculation would facilitate the gamete recovery particularly from convalescent animals,

allowing sperm preservation for an indefinite period of time followed by the application of several other biotechniques such as artificial insemination and in vitro embryo production.

For its execution, anesthesia using the tiletamine-zolazepan or ketamine-xilazine in proportions that vary with the species is needed. However, some drugs seem to interfere with the sperm quality, such as promazine, which allows urine contamination (Morato and Barnabé, 1998). Furthermore, it is important to be aware of the risks involved in the anesthetic procedure. According to Osofsky et al. (1996), the factors that must be considered in selecting a drug include efficiency, safeness, existence of an antagonist, and availability and cost of the drug.

Electroejaculation is based on the controlled electric stimulation of the ejaculatory reflex, through the introduction of a trans-rectal probe with three electrodes, connected to an electric stimulator. The probe is inserted 7-9 cm into the rectum with the electrodes directed ventrally. Care should be taken to evacuate any feces from the rectum. A weak electric current stimulates the nerves supplying the reproductive organs (Platz and Seager, 1978). Different EEJ protocols have been reported but many researchers are using the Wildt et al. protocol (1983). The authors reported a total of 80 electric stimulations divided in three series: 30 stimuli (10 stimuli at 2, 3 and 4 V – series 01), 30 stimuli (10 stimuli at 3, 4 and 5 V – series 02) and 20 stimuli (10 stimuli at 5 and 6 V – series 03) for the collection of semen from South African cheetahs (Acinonyx jubatus), with 5-min intervals between the series. The animal responds to the stimuli with a rigid extension of the hind legs. If this reaction is not seen in series 01 or if stronger stimulation is observed, the electrode may not be in the proper position in the rectum, or there may be interference in the current transmission due to the presence of feces. To collect semen, a gentle pressure applied at the penile base should allow for penile extrusion, and the ejaculate is collected into a pre-warmed test tube that has been placed over the glans penis.

Using electroejaculation, Howard et al. (1984) reported semen collection from more than 28 cat species. Moreover, some researchers have reported successful semen collection from wild felids by using electroejaculation, such as tigers (Panthera tigris - Donoghue et al., 1992), snow leopards (Panthera uncia - Roth et al., 1994), Indian leopards (Panthera pardus - Jayaprakash et al., 2001), caracals (Caracal caracal - Pope et al., 2001), jaguars (Panthera onca - Morato et al., 2001; Silva et al., 2003), ocelots (Leopardus pardalis - Queiroz et al., 2002), margays (L. wiedii) and tigrinas (L. tigrinus - Morais et al., 2002).

Graham et al. (1978) reported the use of electroejaculation to collect semen from non-domestic felids. The authors cryopreserved the samples and found that 25 to 50% sperm motility was preserved after thawing in lions (Panthera leo), jaguars (Panthera onca), leopards (Neofelis nebulosa), cheetahs (Acinonyx jubatus) and leopard cats (Felis bengalensis), and in the latter a 70% sperm motility was maintained. The same authors reported finding lesser values of sperm motility, between 1 and 20% post-thaw, for Indian tigers (Panthera tigris), Geoffroy's cats (Felis geoffroyi) and ocelots (Felis pardalis), but the spermatozoa from gold cats (Felis aurata) did not survive cryopreservation. Furthermore, using electroejaculation to collect the semen, Byers et al. (1989) obtained 40% sperm motility post-thaw in Siberian tigers (Panthera tigris).

In canids, Goodrowe et al. (1998) collected semen by electroejaculation from the red wolves (Canis rufus) and obtained semen of acceptable quality. They followed the cryopreservation technique commonly used for the domestic dog (Canis familiaris), which results in significant damages to wolf spermatozoa, suggesting that further studies on cryoinjury in these species must be performed. Afterwards, Goodrowe et al. (2001) collected semen from 11 adult male red wolves by the same method and used cryopreservation. After thawing, spermatozoa motility was 23.7% and the fertilizing capacity was examined by using a penetration assay in domestic dogs oocytes, with a 18.1% penetration rate. Moreover, Leibo and Songsasen (2002) reported the collection of semen from Mexican gray wolves (Canis lupus), followed by cryopreservation. It appeared as if the gray wolf spermatozoa were also sensitive to freezing and thawing, as only a very low percentage of spermatozoa survived the freezing process.

Hermes et al. (2001) collected semen from African wild dogs (Lycaon pictus) by electroejaculation and performed cryopreservation. These authors found 40% of motile spermatozoa post-thaw and suggested cryopreservation could be used in conservation efforts for gamete rescue of genetically distinct populations threatened by extinction. Recently, successful semen collection

in maned wolves (*Crysocyon brachyurus*) has been performed by electroejaculation (Wildt, unpublished; Songansen, personal communication). However, in some occasions, urine contamination is a barrier to obtaining good sperm quality (Morato, personal communication).

The blue (*Alopex lagopus*) and silver (*Vulpes vulpes*) foxes are commercially valuable canids and are both farmed for their pelts. In these species, semen collection is usually performed by using an artificial vagina (Jalkanen, 1993) or digital masturbation (Forsberg et al., 1989). However, Barta and Jacubicka (1989) reported semen collection from foxes by electroejaculation under halothane anesthesia, which suggests the possibility of using this technique in those canids.

2.3 Collection of epididymal spermatozoa

The epididymus is a component of the male reproductive tract and is attached to the testicle. One of its main functions is the storage of spermatozoa for ejaculation. Present technologies allow for semen collection directly from the epididymus and this seems to be a viable alternative method for obtaining gametes from animals unable to ejaculate or from animals that have recently died. Furthermore, Garde et al. (1998) suggested that viable epididymal spermatozoa from Iberian deers (*Cervus elaphus*) could be collected in the 10 to 20 h *post mortem* period. However, it must be noted that this period would vary according to the weather and temperature conditions where the procedure is being executed.

In studies accomplished with epididymal spermatozoa from domestic cats, it was verified that these spermatozoa require less capacitating time as compared with ejaculated spermatozoa and are able to penetrate feline oocytes 20 min after in vitro insemination (Niwa et al., 1985; Goodrowe and Hay, 1993). Fresh feline epididymal spermatozoa were able to fertilize oocytes in vitro, promoting 40.7% cleavage rate. After freezing, a 26% cleavage rate was obtained (Lengwinat and Blottner, 1994). Bogliolo et al. (2001) reported that after intracytoplasmic sperm injection using feline frozen epididymal spermatozoa, resulted in 34.9% embryos that developed to the morula stage, indicating that spermatozoa with minimal motility could be used in reproductive biotechniques. Moreover, Tsutsui et al. (2002) performed the unilateral intrauterine artificial insemination with frozen-thawed epididymal semen from cats and obtained a 23% (3/11) conception rate.

For non-domestic cats, Jewgenow et al. (1997) demonstrated that spermatozoa were collected from the finely minced cauda epididymus of lions (*Panthera leo*), tigers (*Panthera tigris*), leopards (*Panthera pardus*), pumas (*Felis concolor*) and jaguars (*Panthera onca*). The samples were treated as described by Lengwinat and Blottner (1994), washing the spermatozoa in Hank's balanced salt solution and extended in medium M199 supplemented with 2.5 mMol/L sodium lactate Γ^1 and 0.4% bovine serum albumin. Progressively motile spermatozoa varied between 60% and 85% for the various felids. In this same study, the epididymal semen was frozen and motility between 25% and 65% for the different species that were utilized were obtained after thawing. The frozen semen was then submitted to in vitro fertilization and 18.5% 8-cell embryos developed. Similarly, Morato et al. (1999) provided evidence that frozen epididymal spermatozoa from jaguars were able to penetrate heterologous zona-free oocytes.

Unfortunately, there is no information concerning epididymal semen collection from wild canids. However, procedures developed for domestic dogs (*Canis familiaris*) could be adapted to wild dogs. Thus, Yu and Leibo (2002) obtained canine testes by orchietomy, followed by dissection of the epididymus, which was kept under refrigeration before the isolation of epididymal sperm. These authors found that epididymal spermatozoa could be stored at 4°C for 8 days, while still maintaining motility, intact morphology and the ability to bind to oocytes. Sirivaidyapong (2002) reported that the sperm collection technique could influence post-thaw results suggesting that canine epididymal spermatozoa should be collected by inserting a fine needle in the vas deferens, injecting bovine fetal serum, TCM 199 or Tris-buffer extender. This procedure facilitates washing the epididymal tail with consequent collection of spermatozoa of improved quality. Hewitt et al. (2001) observed that the conventional cryopreservation method for ejaculated canine semen could be adopted for canine epididymal spermatozoa. In addition, Fahrng (2003) reported collection of canine epididymal semen 20 h after orchiectomy if the testes were kept at 15 to 25°C.

Epididymal semen was cryopreserved in pellets and had 1% to 54% sperm motility following thawing.

2.4 Obtaining spermatogonial stem cells

Spermatogenesis is a complex and very efficient process that starts with the division and differentiation of spermatogonial stem cells located in the basal membrane of seminiferous tubules sustained by Sertoli cells (Schlatt, 2002). Mammals have unique spermatogonial stem cells; because they can maintain their proliferation in adults so genetic material can be passed to subsequent generations. Consequently, these cells are a valuable source for biological experimentation, medical research, agricultural biotechnology and genetic modification of the species (Brinster and Nagano, 1998). Recent studies on their recovery and cryopreservation showed the perspective of application in the conservation of genetic material from endangered animal species.

Present methods described for spermatogonial isolation from fragments of recently collected testis consists on elutriation (Bucci et al, 1986) or sedimentation rate in a gradient of bovine serum albumin under gravity force action (Bellvé et al., 1977). Some other isolation techniques have been proposed as immunological markers for posterior magnetic cellular separation (Shinohara et al., 1999). After collection, germ cells can remain for several months in tissue culture media, only resuming spermatogenesis after in an environment that provides favorable conditions for their expansion and differentiation (Nagano et al., 1998). Such favorable conditions are generally provided by transplant to other organisms (Brinster and Zimmerman, 1994).

Brinster and Zimmerman (1994) described the first success in the spermatogonial transplant. They demonstrated that the microinjection of a mouse testis cell heterogeneous suspension into the seminiferous tubules of a recipient mouse, previously confirmed to be sterile, could result in spermatogenesis in the injected animal. After this finding, several other researchers began studies in this area, showing possibilities such as the spermatogonial culture among different species, i.e., the xenograft (Clouthier et al., 1996). Cryopreservation of testis cell suspensions seems to hold the greatest promise for the storage of germ cells to be used later in transplants, as Avarbock et al. (1996) showed that spermatogenesis can continue after cryopreservation.

In spite of the progress in this area, some factors remain to be controlled, such as the ideal number of germ cells to be transplanted, formation of antibodies against spermatogonial cells by the recipient (Ogawa et al., 1999), and poor quality of cells that have developed using these procedures (Russell and Brinster, 1996). There is also a problem concerning xenograft related to the different time of spermatogenesis in each species (França et al., 1998). However, Honaramooz et al. (2002) recently observed complete spermatogenesis after transplantation of testicular tissue fragments from species that are phylogenetically more distant, such as pigs and goats into castrated immunodeficient mice.

As for carnivores, Dobrinsky et al. (1999) were the first to report spermatogonial transplantation from domestic dogs to mice. These authors achieved the dissociation of seminiferous tubules by enzyme digestion with collagenase, DNase and trypsin in pieces of testis from mongrel dogs. Viable spermatogonial germ cells were selected through Trypan blue exclusion. Some seminiferous tubules were cryopreserved using dimethylsulfoxide as cryoprotectant. Fresh or frozen canine testicular tissue was transplanted to several immunodeficient infertile mice and success was determined by immunohistochemistry, which detected the presence of dividing canine germ cells in the recipient mice. Although countless divisions and cellular transformations have been observed, the development of such cells to spermatozoa was not verified.

By using molecular biology techniques and genetics, testicular activity is better understood and provides important data for the development of germ cell recovery methods. Phenomena involved in spermatogenesis are studied by analyzing spermatozoa through flow cytometry (Jewgenow et al., 1997). As relationships between spermatogenic activity and age, season or the inbreeding among non-domestic carnivores are not known, the information obtained with the study of the testicular activity will be very helpful in the future application of reproductive biotechniques in programs of animal conservation.

3. Female gamete recovery

3.1 Ovarian follicles and oocytes

The follicle is the ovarian morphofunctional unit constituted by the oocyte surrounded by somatic cells. When performing its gametogenic function, the follicle is an essential element for maintenance of oocyte viability, seeking to assure growth and maturation of immature oocyte and, finally, to release a mature oocyte by the ovulation process (Figueiredo et al., 2002). It is known that the ovarian follicular population seems to be made up of thousands of follicles in different mammalian females (Driancourt, 1991). Thus, oocyte retrieval represents a rich source of genetic material to be used as a foundation for genetic banks, aiding in endangered species preservation, mainly in relation to the possibility of collecting material originated from *post mortem* or convalescent animals.

Donoghue et al. (1990), Wildt (1991) and Luvoni and Oliva (1993) suggested that the development of efficient methods for *in vitro* maturation (IVM) or fertilization (IVF) of oocytes collected *post mortem* or through ovariectomy is important to prevent the species extinction. Thus, IVM and IVF techniques are adapted for several non-domestic animals (Johnston et al., 1991; Pope et al., 1993), based on systematic studies in domestic animals (Wood et al., 1995; Wolfe and Wildt, 1996), including wild carnivores. Moreover, Rodrigues et al. (2001) suggest that application of oocyte and ovary tissue cryopreservation will help in the conservation of several animal species, with the objective of maintaining biodiversity.

3.2 Recovery of oocytes included in antral follicles

According to Hildebrandt et al. (2000), ultrasonographic images of the reproductive tract offers new opportunities for induction of sexual cycles and ovulation, adoption of superovulating regimens, contraception programs, semen collection and techniques of sperm extraction directly from the testicle, as well as the ovum pick up application.

Pieterse et al. (1988) were the first to describe the ovum pick up technique, which consists on the insertion of an ultrasonographic probe in the female vagina or rectum. Ovarian follicles are then visualized on a monitor, allowing oocyte collection by puncturing the follicles with a fine needle connected to a tube collector. The oocytes could be used in IVM and IVF (Nibart et al., 1997). This technique is extensively used for oocyte collection in cattle and results indicate the possibility of repeated collections in both pregnant and non-pregnant females (Lacaze et al., 1997; Guyader-Joly et al., 1997).

Concerning carnivorous species, ovum pick up using ultrasonography has yet to be reported. This may be due to the difficulty of ovarian visualization, because in bitches the ovary is surrounded by a pouch rich in conjunctive tissue (Silva et al., 1996). Furthermore, there are no commercial probes developed for intravaginal use in either canids or felids. However, in spite of this difficulty, the presence of antral ovarian follicles can be detected by the fluid accumulation in the antral cavity (Hayer et al., 1993). Hermes et al. (2001) were thus able to visualize the follicles and corpora lutea in ovaries of female African wild dogs (*Lycaon pictus*) by transrectal ultrasonography, suggesting the possibility of oocyte puncture in carnivores. Researchers could be underestimating the potential of ultrasonography for assisted reproduction in endangered canids and felids species. The adaptation of this technique would be an important alternative, because it is a non-invasive procedure and it could allow oocyte collection without the risks involved with surgical procedures.

Another possibility for oocytes retrieval is laparoscopy. According to Bush et al. (1978), laparoscopy was effective in the evaluation of reproductive status, particularly ovarian anatomy and function, direct visual biopsy of internal organs, and as a surgical means of fertility control. Laparoscopy is a minimally invasive procedure commonly used for intrauterine deposition of frozen-thawed semen in domestic dogs (Silva et al., 1995) and cats (Farstad, 2000).

For domestic cats, Goodrowe et al. (1988) reported the laparoscopic collection of oocytes, which were inseminated *in vitro* with ejaculated semen. When the developing embryos reached the

4-cell stage, they were transferred to the oviduct of oocyte donors. Thus, five of the six cats receiving embryos became pregnant. In wild felids, Swanson et al. (1996) reported the visualization of changes in the reproductive tract during ovarian stimulation with exogenous gonadotropins in the ocelot (*F. pardalis*) by laparoscopy. Moreover, Pope et al. (2001) reported that multiple laparoscopic oocyte retrievals could be successfully performed in caracal (*Caracal caracal*) after repeated ovarian stimulation with equine (eCG) and human (hCG) chorionic gonadotropin. Embryos could also be reliably produced *in vitro* using cryopreserved spermatozoa and live offspring could be produced after embryo transfer.

Unfortunately, in addition to the individual variability in ovarian response universally observed following gonadotropic hormone administration, there are huge species-specific differences in sensitivity and the optimal dosage determination is not simply a matter of extrapolation (Pope, 2000). Moreover, repeated treatment of domestic cats with eCG and hCG may cause an immune mediated refractoriness to ovarian stimulation, dictating that the suitability of these hormonal combinations should be further investigated (Swanson et al., 1995). Similarly, protocols using porcine FSH and LH resulted in reduced numbers of follicles at the second treatment as compared with the first (Morato et al., *in press*), possibly due to a humoral immune response. By considering the feasibility of fecal steroid analyses with radioimmunoassay (Brown et al., 1994) combined with sexual behavior and ultrasonographic images it is possible to determine the more ideal time for oocyte recovery by laparoscopy, without the use of exogenous gonadotropins.

In addition, Jewgenow et al. (1997) suggested that the collection of ovaries from tigers (*Panthera tigris*), lions (*Panthera leo*), pumas (*Felis concolor*), cheetahs (*Acinonyx jubatus*), leopards (*Panthera pardus*) and jaguars (*Panthera onca*) could be accomplished by ovary dissection 8 h after the death of these animals, followed by mechanical follicle isolation. By performing this procedure, the authors obtained 16 ± 2 cumulus-oocyte complexes with acceptable quality, which were submitted to IVM and IVF using homologous semen or heterologous epididymal domestic cat semen. The most desirable results were obtained with lion oocytes fertilized by lion sperm, with a 31.6% (18/44) conception rate. This research also provides evidence that leopard oocytes can be fertilized by domestic cat sperm and used in *in vitro* fertilization procedures to produce 22% (2/9) 8-cell embryos. Otherwise, domestic cat oocytes can be fertilized by leopard spermatozoa, producing 19.5% (8/41) 8-cell embryos.

Pope et al. (1993) performed oocyte collection from domestic and non-domestic cats by laparotomy and posterior ovary dissection. These oocytes were submitted to IVF and then transferred to receiving females. The main result obtained in this study was the interspecies embryo transfer from an Indian desert cat (*Felis silvestris ornata*) embryo to a domestic cat (*Felis catus*), which resulted in the birth of two kittens. Afterwards, Pope et al. (1997) recovered ovaries from domestic cats by ovariectomy and demonstrated that morphology of the oocyte ooplasm can affect *in vitro* maturation, as well as the gonadotropin supplementation. According to the morphological aspect by stereomicroscopical exam, cumulus-oocyte complexes were classified as mature, immature or degenerated. Besides the successful embryo production by IVF using this approach, light and electron microscopic evaluations revealed that ovarian stimulation followed by follicular aspiration resulted in a heterogenous oocyte population with respect to meiotic maturation. The correct assessment of the oocyte maturation status is difficult to perform through stereomicroscopical exam (Gjorret et al., 2002).

Domestic bitches have ovulations of an immature oocyte in a germinal vesicle stage and they require around 2 days meiotic maturation to be complete (Silva et al., 2002). Hay et al. (1997) reported that canine oocytes could be collected by ovari-hysterectomy and be immediately used in IVF, or after freezing at -18°C . However, as for laparotomy, this collection technique is an invasive procedure and should be considered as the last alternative for convalescent animals due to the risks and stress it causes to the animals. Moreover, Rodrigues and Rodrigues (2003) reported that oocyte quality is a more reliable indicator of its potential for meiotic maturation *in vitro* as compared with the hormonal environment of the donor female at the time of oocytes retrieval, as the *in vitro* nuclear maturation of dog oocytes is not influenced by the *in vitro* reproductive status of the female.

The use of IVF in canine species was not particularly successful in facilitating reproduction. Metcalf (1999) supplemented the culture medium with gonadotropins and observed its beneficial effect on the nuclear maturation of canine oocytes. Furthermore, the formation of canine 8-cell embryos was obtained after 96 h of IVF and culture, representing 2.4% of the total oocytes fertilized in vitro. Otoi et al. (2000) reported 13% in vitro fertilized canine oocytes, but only 0.5% oocytes used in the experiment reached the phase of initial blastocyst. According to these authors, canine oocytes could be developed to the blastocyst stage after IVM, IVF and culture, although the competence of the oocyte developing is significantly reduced after these procedures.

Unfortunately, oocyte recovery studies for wild canids are rare. Farstad et al. (1993) collected the ovaries from six blue foxes (*Alopex lagopus*) immediately after their death. They performed oocyte isolation and selection by stereomicroscopy. This study provided evidence that vulpine oocytes could be fertilized and reach the initial embryonic development stage, because five of 13 ova had cleaved into the 2-cell stage at 24 h after insemination, but only one developed into a morula by 144 h. Afterwards, Farstad et al. (2001) collected ovaries from seven blue foxes after ovulation from the dominant follicles and obtained the oocytes by blind aspiration from subordinate antral follicles. MIV and FIV were performed and 75 of 125 oocytes (60%) underwent germinal vesicle breakdown within 48 h after insemination, suggesting that immature oocytes from subordinate follicles are able to mature and be fertilized.

Oocytes can be preserved if they are not immediately submitted to IVF. However, Aman and Parks (1994) observed that cooling could cause chromosomal anomalies in mature oocytes, as a consequence of the temperature decrease on meiotic fusion. Rodrigues et al. (2002) performed the IVM of domestic feline oocytes, previously kept under refrigeration at 4°C for 24 h, and they did not observe deleterious effects of storage on oocyte meiotic progression. Moreover, Herrick and Swanson (2003) demonstrated that even brief (2-3 weeks) salt storage significantly affects cat oocyte penetration rate, and the penetration continues to decline as storage duration increases to 2-3 months. However, the authors hypothesized that the composition of the solution may have contributed to reduced sperm penetration. For canine species, Mastromonaco et al. (2002) found that oocyte storage in hypertonic salt solution damages the zona *pellucida*, reducing the sperm penetration rates. These authors also observed that the integrity of cumulus cells is necessary for an enhanced interaction between the oocytes and the canine spermatozoa.

It has already been demonstrated that the cryopreservation of oocytes originating from antral follicles is successful in mice (Carrol and Gosden, 1993), rabbits (Vicent et al., 1989) and bovine (Fuku et al., 1992), followed by IVF after thaw, resulting in the birth of normal offspring in all of these species. In domestic felines, Luvoni and Pellizzari (2000) demonstrated that the mature oocyte could be cryopreserved and, soon after, fertilized in vitro with success.

3.3 Recovery of preantral follicles

Although the maturation of oocyte recovered from antral follicles is an efficient method for the use of haploid female material, it may be possible to also increase the efficiency of the oocyte utilization by activation in initial phases of development (Jewgenow et al., 1997). The preantral ovarian follicles (PAF) represent 90% of the follicular population in mammals (Figueiredo et al., 2002). Small PAF recovered from the ovaries collected from *post mortem* animals or through ovariectomy, therefore, are a rich oocyte source, because they can mature in vitro.

In canids, PAF retrieval studies are extremely scarce. In 1987, Telfer and Gosden observed that the domestic bitch present a great number of PAF containing several oocytes. Durrant et al. (1998) accomplished canine PAF isolation and characterization, and suggested the use of the enzymatic digestion associated to the mechanical isolation. Bolamba et al. (1998) verified that after the enzyme method that uses collagenase and DNase for the isolation, PAF could be cultivated in vitro and oocytes would be capable of reinitiate the meiotic divisions.

In 1993, Jewgenow and Pitra reported that feline PAF are capable of developing in vitro to the antral phase. Moreover, Jewgenow and Goritz (1995) demonstrated the isolation of PAF from domestic cats by mechanical ovary dissection. By adapting the methods described for domestic cats to non-domestic felid species, Jewgenow and Stolt (1996) accomplished the isolation and the ultra-

structural characterization of PAF from cheetahs, jaguars, lions and Sumatran, Siberian and Bengal tigers that had died at local zoos. These authors verified the similarity among domestic and non-domestic felid PAF. Later on, Jewgenow et al. (1997) recovered $1,867 \pm 1,144$ PAF from each ovary from several species of non-domestic felids, observing that the follicle growth is possible in the culture medium for up to 14 days, with a 20% increase ($40 \mu\text{m}$ to $50 \mu\text{m}$) on the diameter of preantral follicles from the puma.

These promising results suggest the possibility of future use of preantral follicles as a source of oocytes to be used in other biotechniques, as the foundation for germoplasm banks, as Jewgenow et al. (1998) reported that it is possible to maintain the viability of PAF from domestic cats after cryopreservation procedures.

3.4 Ovarian tissue preservation and culture

Bert (1863) was the first to report an ovarian transplantation. A significant impact on the vascular anastomosis techniques of several transplanted organs, including the ovary, was only achieved in the twentieth century, with the studies by Carrel and Guthrie (1906). According to Salle et al. (2002), both whole ovary and ovarian fragment transplantations could be used for ovarian follicle cultures. Moreover, Shaw et al. (2000) reported that a great advantage for the preservation and culture of ovarian tissue is due to the possibility of material collection not dependent upon the age or reproductive status of the donor.

Bogliolo et al. (1993) suggested that the term alotransplantation refers to the transplantation of an organ originating from one individual to another that is genetically different, but belonging to the same species. McCone (1899) was the first to report a canine ovarian tissue alotransplant to the broad ligament of another bitch, which resulted in pregnancy. In 2001, Metcalf et al. obtained a canine ovarian tissue xenografting to the renal capsule of several immunodeficient infertile mice. The mice necropsy was done after 56 days, when the follicular development was confirmed, but the antral formation of follicles was not visualized.

Gosden et al. (1994) performed the transplant of ovarian cortex fragments from domestic cats to the renal capsules of severely immunodeficient infertile mice. After 9 months, the necropsy of the recipient mice was accomplished, when the presence of follicles was verified in the grafts. These ovarian follicles reached a 3 mm diameter, had a normal antral cavity and appeared to be cytologically normal. However, ovulation was not observed in any of the grafts. Furthermore, Bosch et al. (2002) reported that freeze-thawed cat ovarian cortex not only survives xenotransplantation into the kidney capsule from severe combined immunodeficient mice but also contains follicles able to grow to antral stages containing gonadotropin responsive granulosa cells.

According to Ledda et al. (2001), oocytes and ovarian tissue cryopreservation is not yet fully established. There are still several obstacles to overcome for this technology to be routinely used. Even so, improvement in the cryopreservation techniques is seen as an important tool for the formation of ovarian tissue banks, with the purpose of conserving endangered species (Paris, 2002).

4. Final Considerations

As reviewed, there are several methods available for recovering gametes from non-domestic canids and felids, including healthy, convalescent animals or animals that recently died. However, even if these gametes would be a valuable resource in the formation of cryobanks by contributing to the preservation of genetic material essential for the maintenance of the species, there are many obstacles to overcome, such as the improvement of the cryopreservation protocols for both male and female gametes, hormone supplements in the medium for IVM and IVF, compatible recipients for the embryos produced in laboratory, and suitable habitats to receive the animals that are produced by assisted techniques.

According to Wildt et al. (2001a), effective techniques in domestic species are not necessarily applicable to wild species. Reproductive mechanisms are highly varied among animal groups. Without understanding the fundamentals of reproductive processes, assisted breeding can never become consistently successful. There is no doubt that the reproductive sciences can

contribute to carnivore conservation, but the first priority must always be the production of new basic knowledge that eventually may have applications in the management of these animals. Once this information is known, wildlife can be propagated by using improved natural or assisted breeding.

In addition, the use of stored gametes requires further studies. Sub-specific populations can become independent from other populations through natural or historical events. The non-studied introduction of gametes or new individuals into a population can produce undesirable hybrids, which can accelerate the genetic extinction of the native population in just a few years (Wayne and Brown, 2001).

Reproductive science is only one component of an abundantly complex conservation puzzle and can contribute to wildlife conservation, but only in the context of problems being simultaneously addressed by wildlife and habitat management, ecology, population biology, behavior, nutrition, genetics, veterinary medicine, sociology and conflict resolution. Genuine conservation is achieved only when the reproductive knowledge and technologies are integrated into multidisciplinary programs that conserve species integrity *ex situ* and preferably *in situ* (Wildt et al., 2001b).

Currently, several ecosystems are being destroyed by human actions, beginning the process of extinction of several species. Scientific research, however, improves or develops new reproductive biotechniques. Thus, the application of these techniques could minimize the effects of the devastation. Even so, there is no sense in using them just to multiply animals in the laboratory. It is necessary to have a habitat prepared to receive these animals after they are produced. There needs to be an awareness of actions and their consequences by trying to develop ways of expanding the land mass used by humans, but still allowing a peaceful coexistence with all of the ecosystems.

References

- Aman, R.R. and Parks, E.J., 1994. Effects of cooling and rewarming of the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 50: 103-110.
- Avarbock, M.R., Brinster, C.J., Brinster, R.L., 1996. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat. Med.*, 2: 693-696.
- Bainbridge, D.R.J. and Jabbour, H.N., 1998. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. *Vet. Rec.* 143: 159-168.
- Barta, M. and Jakubicka, I., 1989. Collection of sperm from foxes using electroejaculation under halothane anesthesia. *Vet. Med.*, 34: 637-640.
- Bellvé, A.R., Cavicchia, J.C., Millette O'Bryen, D.A., Bhatnagar, Y.M., Dym, M., 1977. Spermatogenic cell of the prepuberal mouse: isolation and morphological characterization. *J. Cell. Biol.*, 74: 68-85.
- Bert, P., 1863. *De la greffe animale*. Thesis Medicale, Paris, France.
- Bogliolo, G.B.G., Pereira, F.E.L., Vitela, J.E.H., Bambirra, E.A., Barbosa, A.J.A., 1993. Degenerações. In: G.F. Brasileiro, F.E.L. Pereira, J.E.H. Pittela, E.A. Bambirra, A.J.A. Barbosa (Eds.), *Patologia Geral*. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. pp 51-59.
- Bogliolo, L., Leoni, G., Ledda, S., Naitana, S., Zedda, M., Carluccio, A., Pau, S., 2001. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 56: 955-967.
- Bolamba, D., Borden-Russ, K.D., Durrant, B.S., 1998. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49: 933-942.
- Bosch, P., Hernandez-Fonseca, H.J., Miller, D.M., Wininger, J.D., Massey, J.B., Brackett, B.G. 2002. Cryopreservation and development of antral follicles in cat ovarian tissue after transplantation into *nod scid* mice. *Theriogenology*, 57: 362 (Abstr.).
- Brinster, R.L. and Nagano, M., 1998. Spermatogonial stem cells transplantation, cryopreservation and culture. *Cell. Dev. Biol.*, 9: 401-409.

- Brinster, R.L. and Zimmermann, J.W., 1994. Spermatogenesis following male germ cell transplantation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 11298 – 11302.
- Brown, J.L., Wasser, S.K., Wildt, D.E., Graham, L.H., 1994. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biol. Reprod.*, 51:776-786.
- Bucci, L.R., Brock, W.A., Johnson, T.S., Meistrich, M.L., 1986. Isolation and biochemical studies of enriched populations of spermatogonia and early spermatocytes from rat testes. *Biol. Reprod.*, 34: 195-206.
- Bush, M., Wildt, D.E., Kennedy, S., Seager, S.W. 1978. Laparoscopy in zoological medicine. *JAVMA*, 173: 1081-1087.
- Byers, A.P., Hunter, A.G., Seal, U.S., Binczik, G.A., Graham, E.F., Reindi, N.J., Tilson, R.L., 1989. In vitro induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of Siberian tiger (*Panthera tigris*). *J. Reprod. Fertil.*, 86: 599-607.
- Carrel, A. and Guthrie, C.C., 1906. Technique de la transplantation homoplastique de l'ovarie. *C.R. Séances Soc. Biol.* 6: 466-468.
- Carrol, J. and Gosden, R.G., 1993. Transplantation of frozen thawed mouse primordial follicles. *Hum. Reprod.*, 8: 1163-1167.
- Clouthier, D.E., Avarbock, M.R., Maika, S.D., Hammer, R.E., Brinster, R., 1996. Rat spermatogenesis in mouse testis following spermatogonial stem cells transplantation. *Nature*, 381: 418-421.
- Dobrynsky, I., Avarbock, M., Brinster, R. 1999. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol. Reprod.*, 61: 1331-1339.
- Donoghue, A.M., Johnston, L.A., Seal, U.S., Armstrong, D.L., Tilson, R.L., Wolf, P., Petrini, K., Simmons, L.G., Gross, T., Wildt, D.E., 1990. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol. Reprod.*, 43: 733-744.
- Donoghue, A.M., Johnston, L.A., Seal, U.S., Armstrong, D.L., Simmons, L.G., Gross, T., Tilson, R.L., Wildt, D.E., 1992. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 96: 555-564.
- Driancourt, M.A., 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, 35: 55-63.
- Durrant, B.S., Pratt, N.S., Russ, K.D., Bolamba, D., 1998. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49: 917-932.
- Fahring, B.M. 2003. Cryopreservation by pellet freezing of epididymal and ejaculated spermatozoa from male dogs. Thesis, Graduate Faculty - Louisiana State University, USA, 116p.
- Farstad, W., 2000. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *An. Reprod. Sci.* 60-61: 375-387.
- Farstad, W., Hyttel, P., Grondahl, C., Krogenaes, A., Mondain-Monval, M., Hafne, A.L., 1993. Fertilization in vitro of oocytes matured in vivo in the blue fox (*Alopex lagopus*). *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 219-226.
- Farstad, W., Hyttel, P., Hafne, A.L., Nielsen, J. 2001. Maturation and fertilization of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57: 161-165.
- Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., Amorim, C.A., 2002. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos. In: P.B.D. Gonsalves, J.R. Figueiredo, V.J.F. Freitas (Eds.), *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. Varella, São Paulo, pp 227-260.
- Forsberg, M., Fougner, J.A., Hofmo, P.O., Malgorzata, M., Einarsson, E.J., 1989. Photoperiodic regulation of reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). *J. Reprod. Fertil.*, 87: 115-123.
- França, L., Ogawa, T., Avarbock, M.R., Brinster, R.L., Russel, L., 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, 59: 1371-1377.
- Fuku, E., Kojima, T., Shioya, Y., Marcus, G.J., Downey, B.R., 1992. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, 29: 485-492.
- Garde, J.J., Ortiz, N., Garcia, A.J., Lopez, A., Gallego, L., 1998. Criopreservación postmortem de material espermático e inceminación artificial en el ciervo ibérico. *Arch. Zoot.* 47: 351-356.

- Gittleman, J.L., Funk, S.M., Macdonald, D.W., Wayne, R.K. 2001. Why 'carnivore conservation'? In: Gittleman, J.L., Funk, S.M., Macdonald, D.W., Wayne, R.K. (Eds) Carnivore Conservation. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 1-7.
- Gjorret, J.G., Crichton, E.G., Loskutoff, N.M., Armstrong, D.L., Hyttel, P., 2002. Ultrastructure of oocyte maturation, fertilization, and early embryo development in vitro in the Siberian Tiger (*Panthera tigris altaica*). Mol. Reprod. Dev., 63: 79-88.
- Goodrowe, K.L., Wall, R.J., O'Brien, S.J., Schmidt, P.M., Wildt, D.E. 1988. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. Biology of Reproduction, 39:355-372.
- Goodrowe, K.L. and Hay, M.A., 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. Theriogenology, 40: 967-975.
- Goodrowe, K.L., Hay, M.A., Platz, C.C., Behrns, S.K., Jones, M.H., Waddell, W.T. 1998. Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. Anim. Reprod. Sci., 53: 299-308.
- Goodrowe, K.L., Mastromonaco, G.F., Walker, S.L., Bateman, H.L., Ryckman, D.P., Platz, C.C., Waddell, W.T. 2001. In vitro maintenance, cooling and cryopreservation of red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 57: 387-392.
- Goodrowe, K.L., Walker, S.L., Ryckman, D.P., Mastromonaco, G.F., Hay, M.A., Bateman, H.L., Wadell, W.T., 2000. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. Anim. Reprod. Sci., 60-61: 389-403.
- Gosden, R.G., Boulton, M., Grant, K., Webb, R., 1994. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. J. Reprod. Fertil., 101: 619-623.
- Graham, E.F., Schmeihl, M.K.L., Evensen, B.K., Nelson, D.S., 1978. Semen preservation in non-domestic mammals. In: Symposium of Zoological Society of London, 43: 153-173.
- Guyader-Joly, C., Ponchon, S., Thuard, J.M., Durand, M., Nibart, M., Marquant Le Guienne, B., Humblot, P., 1997. Effects of superovulation on repeated ultrasound guided oocyte collection and in vitro embryo production in pregnant heifers. Theriogenology, 47: 157 (Abstr.).
- Hay, M.A., King, W.A., Gartley, C.J., Leibo, S.P., Goodrowe, K.L., 1997. Canine spermatozoa – Cryopreservation and evaluation of gamete interaction. Theriogenology, 48: 1329-1342.
- Hayer, P., Gunzel-Apel, D., Luerssen, D., Hoppen, H.O., 1993. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 93-100.
- Hermes, R., Goritz, F., Maltzan, J., Blottner, S., Proudfoot, J., Fritsch, G., Fassbender, M., Quest, M., Hildebrandt, T.B. 2001. Establishment of assisted reproduction technologies in female and male African wild dogs (*Lycaon pictus*). J. Reprod. Fertil. Suppl. 57: 315-321.
- Herrick, J.R., Swanson, W.F. 2003. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. Theriogenology. 59: 1503-1513.
- Hewitt, D.A., Leahy, R., Sheldon, I.M., England, G.C.W., 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. Anim. Reprod. Sci., 67: 101-111.
- Hildebrandt, T.B., Hermes, R., Jewgenow, K., Góritz, F., 2000. Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species. Theriogenology, 53: 73-84.
- Honaramooz, A., Snedaker, A., Boiani, M., Scholer, H., Dobrinski, I., Schlatt, S., 2002. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. Nature, 418: 778-781.
- Howard, J.G., Bush, M., Hall, L.L., Wildt, D.E., 1984. Morphological abnormalities in spermatozoa of 28 species of non-domestic felids. In: Proc. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Urbana Champaign.
- Howard, J.G. 1999. Assisted reproductive techniques in non-domestic carnivores. In: M.E. Fowler and R.E. Miller (Editors), Zoo and Wild Animal Medicine, Saunders, Toronto, pp 449-457.
- Jalkanen, L., 1993. Sperm abnormalities in silver fox (*Vulpes vulpes*) semen selected for artificial insemination. J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 287-290.
- Jayaprakash, D., Patil, S.B., Kumar, M.N., Majumdar, K.C., Shivaji, S. 2001. Semen characteristics of the captive Indian leopard, *Panthera pardus*. J. Androl.22: 25-33.

- Jewgenow, K. and Goritz, F., 1995. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. *Anim. Reprod. Sci.*, 39: 285-297.
- Jewgenow, K. and Pitra, C., 1993. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology*, 39: 527-535.
- Jewgenow, K. and Stolt, M., 1996. Isolation of preantral follicles from non-domestic cats – viability and ultrastructural investigations. *Anim. Reprod. Sci.*, 44: 183-193.
- Jewgenow, S., Blottner, S., Lengwinat, T. and Meyer, H.H.D., 1997. New methods for gamete rescue from gonads of non-domestic felids. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51: 33-39.
- Jewgenow, S., Penfold, L.M., Meyer, H.H., Wildt, D.E., 1998. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.*, 112: 39-47.
- Johnston, L.A., Donogue, A.M., O'Brien, S.J., Wildt, D.E., 1991. Rescue and maturation in vitro of follicular oocytes collected from non-domestic felid species. *Biol. Reprod.*, 45: 898-906.
- Lacaze, S., Marquant Le Guienne, B., Delalleau, N., Richef, L., Maunas, S., Nibart, M., Humblot, P., 1997. Centralized in vitro embryo production after ultrasound guided bovine oocyte collection: effects of parity and superovulation treatment. *Theriogenology*, 47: 161 (Abstr.).
- Ledda, S., Leoni, G., Bogliolo, L., Naitana, S., 2001. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue bank. *Theriogenology*, 55: 1359-1371.
- Leibo, S.P., Songsasen, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57:303-326; 2002.
- Lengwinat, T. and Blottner, S., 1994. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 35: 291-301.
- Luvoni, G.C. and Oliva, O., 1993. Effect of medium-199 and fetal calf serum on in vitro maturation of domestic cat oocytes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 203-207.
- Luvoni, G.C. and Pellizzari, P., 2000. Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology*, 53: 1529-1540.
- Mastromonaco, G.F., Hay, M.A., Goodrowe, K.L., 2002. The effect of oocyte storage and Cumulus cell presence on canine zone penetration by domestic dog spermatozoa. *Theriogenology*, 57: 1123-1134.
- McCone, J.F., 1899. Preliminary report on transplantation of the ovaries. *Am. J. Obst.*, 40: 214-218.
- Metcalf, S., 1999. Assisted reproduction in the bitch. Thesis, Institute of Reproduction and Development – Faculty of Science, Monash University, Australia, 161p.
- Metcalf, S., Shaw, J.M., Gunn, I.M., 2001. Xenografting of canine ovarian tissue to ovariectomized severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J. Reprod. Fertil.*, 57: 323-329.
- Morais, R.N., Mucciolo, R.G., Gomes, M.L.F., Lacerda, O., Moraes, W., Moreira, N., Graham, L.H., Swanson, W.F., Brown, J.L., 2002. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology*, 57: 2027-2041.
- Morato, R.G. and Barnabé, R.C., 1998. Biotécnicas de reprodução aplicadas à preservação de felídeos selvagens. *Clin. Vet.*, 12: 24-26.
- Morato, R.G., Nelson, K., Finnegan, J., Volenec, D., Loskutoff, N.M., 1999 Efeito do crioprotetor e método de descongelamento sobre o espermatozóide epididimal de onça pintada (*Panthera onca*) para a fertilização in vitro com oócitos heterólogos. *Arq Fac Vet UFRGS*, 27:266 (Abst.).
- Morato, R.G., Conforti, V.A., Azevedo, F.C., Jacomo, A.T.A., Silveira, L., Guimarães, M.A.B.V., Nunes, A.L.V., Barnabé, R.C., 2001. Comparative analyses of ejaculate-endocrine characteristics of free living versus captive jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction*, 122: 745-751.
- Nagano, M., Avarbock, M.R., Leonida, E.B., Brinster, C.J., Brinster, R.L., 1998. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell*, 30: 389-397.
- Nibart, M., Marquant Le Guienne, B., Humblot, P., Guerin, B., 1997. The application of new reproductive technologies in France. *Arq. Fac.Vet. UFRGS*, 25: 21-35.
- Niwa, K., Ohara, K., Hosoi, Y., Iritani, A. 1985. Early events of in vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 74: 657-660.

- O'Brien, S.J., Roelke, M.E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C.A., Meltzer, L., Colly, L., Evermann, I.F., Bush, M., Wildt, D.E., 1985. Genetics basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*, 277: 1428-1434.
- Ogawa, T., Dobrinsky, I., Brinster, R., 1999. Recipient preparation is critical for the spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue Cell*, 31: 461-472.
- Osofsky, S.A., McNutt, J.W., Hirsh, K.J. 1996. Immobilization of free-ranging African wild dogs (*Lycaon pictus*) using a ketamine/xilazine/atropin combination. *J. Zoo. Wild. Med.*, 27: 528-532.
- Otoi, T., Murakami, M., Fujii, M., Tanaka, M., Ooka, A., Une, S., Suzuki, T., 2000. Development of canine oocytes matured and fertilized in vitro. *Vet. Rec.*, 146: 52-53.
- Paris, M.C.J. 2002. Xenotransplantation and its potential role in assisted reproduction and animal conservation. In: *Proceedings of The 2nd International Symposium on Assisted Reproductive Technology for the Conservation and Genetic Management of Wildlife, Nebraska*. p. 233-246.
- Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruij, T.A.M., Taverne, M.A.M., 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-762.
- Platz, C.C., Seager, S.W. 1978. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 1353-1355.
- Pope, C.E. 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*. 53: 163-174.
- Pope, C.E., Keller, G.L., Dresser, B.L., 1993. In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, developments in vitro, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 189-201.
- Pope, C.E., McRae, M.A., Plair, B.L., Keller, G.L., Dresser, B.L. 1997. In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51: 69-82.
- Pope, C.E., Gomez, M.C., Davis, A.M., Harris, R.E., Mikota, S.K., Boyd, E.H., Dresser, B.L. 2001. Oocyte retrieval, in vitro fertilization and embryo transfer in the caracal (*Caracal caracal*). *Theriogenology*, 55: 397 (Abst.).
- Purvis, A., Mace, G.M., Gittleman, J.L. 2001. Past and future carnivore extinctions: a phylogeny prospective. In: *Gittleman, J.L., Funk, S.M., Macdonald, D.W., Wayne, R.K. (Eds) Carnivore Conservation*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 11-34.
- Queiroz, V.S., França, G.D., Adania, C.H., Guimarães, M.A.B.V. 2002. Evidence of cold induced damage in spermatozoa of ocelots (*Leopardus pardalis*) after short term transportation. In: *Proceedings of The 2nd International Symposium on Assisted Reproductive Technology for the Conservation and Genetic Management of Wildlife, Nebraska*. p. 303-305.
- Rodrigues, A.P.R., Amorim, C.A., Brasil, A.F., Figueiredo, J.R.F., 2001. Criopreservação de oócitos mamíferos: importância, estado atual, limitações e perspectivas. *Ci. Anim.*, 11: 101-112.
- Rodrigues, B.A., Santos, L.C., Rodrigues, J.L., 2002. In vitro oocyte maturation of pre-cooled domestic cat ovaries. In: *Proc. 3rd EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals, Liège, Belgium*, p.156-157.
- Rodrigues, B.A., Rodrigues, J.L. 2003. Influence of reproductive status on in vitro oocytes maturation in dogs. *Theriogenology*, 60: 59-66.
- Rodrigues, F.H.G. 2002. *Biologia e conservação do lobo guará na estação ecológica de Águas Emendadas, DF*. Thesis, Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil, 96p.
- Roelke, M.E., Marterson, J.S., O'Brien, S.J., 1993. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Curr. Biol.*, 3: 340-350.
- Roth, T.L., Howard, J.G., Donoghue, A.M., Swanson, W.F., Wildt, D.E. 1994. Function and culture requirements of snow leopard (*Panthera uncia*) spermatozoa *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 101:563-569.
- Russell, L.D. and Brinster, R.L., 1996. Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *J. Androl.*, 17: 615-627.

- Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Rudigoz, R.C., Guerin, J.F., Lornage, J., 2002. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil. Steril.*, 77: 403-108.
- Schlatt, S., 2002. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 187: 107-111.
- Shaw, J.M., Oranratnachai, J.M., Trounson, A.O. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53:59-72.
- Shinohara, T., Avarbock, M.R., Brinster, R.L., 1999. Beta 1- and alpha 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 11: 5504-5509.
- Silva, A.R., Mattos, M.R.F., Cardoso, R.C.S., Silva, T.F.P., Uchoa, D.C., Filgueira, K.D., Cardoso, J.F.S., Aguiar, L., Monteiro, C.L.B., Silva, L.D.M., Aguiar, G.V., Morato, R.G. 2003. Avaliação andrológica de uma onça pintada (*Panthera onca*) oriunda da região norte do Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 27: 217-219.
- Silva, L.D.M., Onclin, K., Snaps, F., Verstegen, J., 1995. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology*, 43: 615- 623.
- Silva, L.D.M., Onclin, K., Verstegen, J.P., 1996. Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. *Vet. Rad. Ultrasound*, 37: 313-320.
- Silva, L.D.M., Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., 2002. Inseminação artificial em cães. In: P.B.D. Gonsalves, J.R. Figueiredo, V.J.F. Freitas (Eds.), *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. Varella, São Paulo, pp. 69-95.
- Sirivaidyapong, S., 2002. Motility and viability of canine epididymal sperm collected by different methods. In: *Proc. 3rd EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals*. Liège, Belgium, p.170.
- Swanson, W.F., Horohov, D.W., Godke, R.A., 1995. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. *J. Reprod. Fertil.*, 105: 35-41.
- Swanson, W.F., Howard, J.G., Roth, T.L., Brown, J.L., Alvarado, T., Burton, M., Starnes, D., Wildt, D.E., 1996. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *J. Reprod. Fertil.*, 106: 87-94.
- Telfer, E. and Gosden, R.G., 1987. A quantitative cytological study of poliovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J. Reprod. Fertil.*, 81: 137-147.
- Tsutsui, T., Wada, M., Anzai, M., Hori, T. 2002. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 397-399.
- Vicent, C., Garnier, V., Heyman, Y., Renard, JP., 1989. Solvent effects of cytoskeletal organization and in vivo after freezing rabbit oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 87 809-820
- Watson, P.F., 1978. A review of techniques of collection in mammals. *Symp. Zool. Soc. London*, 43: 97-126.
- Wayne, K., Brown, D.M. 2001. Hybridization and conservation of carnivores. In: Gittleman, J.L., Funk, S.M., Macdonald, D.W., Wayne, R.K. (Eds) *Carnivore Conservation*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 145-162.
- Wildt, D.E., 1991. Fertilization in cats. In: B.S. Dunbar and M.G. O'Rand (Eds.), *A comparative overview of mammalian fertilization*. Plenum Press, New York, pp 299-328.
- Wildt, D.E., 1997. Genome resource banking: impact on biotic conservation and society. In: A.M. Karrow and J. Critster (Editors), *Reproductive Tissue Banking*, Academic Press, New York, pp 399-439.
- Wildt, D.E., Bush, M., Howard, J.G., O'Brien, S.J., Meltzer, D., Van Dyk, A., Ebedes, H., Brandes, D.J., 1983. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol. Reprod.*, 29: 1019-1025.
- Wildt, D.E., Howard, J., Brown, J. 2001a. Role of reproductive sciences in carnivore conservation. In: Gittleman, J.L., Funk, S.M., Macdonald, D.W., Wayne, R.K. (Eds) *Carnivore Conservation*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 359-371.

- Wildt, D.E., Ellis, S., Howard, J.G. 2001b. Linkage of reproductive sciences: from “quick fix” to “integrated” conservation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57: 295-307.
- Wolfe, B.A. and Wildt, D.E., 1996. Development to blastocysts from in vitro maturation and fertilization of domestic cat oocytes following prolonged cold storage ex situ. *J. Reprod. Fertil.*, 106: 135-141.
- Wood, T.C., Byers, A.P., Jennete, B.E., Wildt, D.E., 1995. Influence of protein and hormone supplementation on in vitro maturation of domestic cat eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 104: 315-323.
- Yu, I. and Leibo, S.P., 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 degrees C. *Theriogenology*, 57: 1179-1190.