

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

ANTONIO CAVALCANTE MOTA FILHO

**Efeito da adição de dimetilformamida ao diluente
ACP-106 C sobre as características do sêmen canino
congelado**

FORTALEZA, CEARÁ

Dezembro, 2009

**Efeito da adição de dimetilformamida ao diluente
ACP-106 C sobre as características do sêmen canino
congelado**

Área de Concentração: Reprodução e
Sanidade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Daniel
Machado da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre
Rodrigues Silva

FORTALEZA, CEARÁ
Dezembro, 2009

Mota Filho, Antonio Cavalcante

Efeito da Adição de Dimetilformamida ao Diluente ACP-106 C Sobre as Características do Sêmen Canino Congelado / Antonio Cavalcante Mota Filho. _Fortaleza, 2009.

103p.; il.

Orientador: Lúcia Daniel Machado da Silva.

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

1. Dimetilformamida, 2. Água de Coco em Pó, 3. Cão, 4. Refrigeração, 5. Sêmen, 6. Crioprotetor. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.089

Universidade Estadual do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho: Efeito da adição de dimetilformamida ao diluente ACP-106 C sobre as características do sêmen canino congelado

Autor: Antonio Cavalcante Mota Filho

Defesa em: 09/12/2009

Conceito obtido: Satisfatório

Nota obtida: 9,0

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

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva
Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Co-Orientador

Prof. Dr. Ricardo Toniolli
Universidade Estadual do Ceará
Examinador

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura
Universidade Federal do Ceará
Examinador

DEDICATÓRIA

Ao meu pais **Antonio Cavalcante Mota** e **Lúcia Maria Nascimento Vale Mota**. A eles ofereço e dedico essa dissertação e toda minha vida.

HOMENAGEM

A duas pessoas fundamentais em minha vida, meus pais **Antonio Cavalcante Mota e Lúcia Maria Nascimento Vale Mota**, pelo amor, compreensão, ensinamentos, apoio e, principalmente, pela estrutura familiar.

AGRADECIMENTOS

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

À minha família, meus pais Antonio Cavalcante Mota e Lúcia Maria Nascimento Vale Mota, Giuliane Nascimento Vale Mota, Gabriela Nascimento Vale Mota e meus sobrinhos Pedro Antonio e Antonio Davi, por ser essa família maravilhosa que eu tanto amo, sempre me apoiando, incentivando e ajudando-me a enfrentar as mais variadas situações.

Ao meu padrinho Adolfo e madrinha Cleide, por serem praticamente meus pais e que sempre me ajudam.

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

Ao meu co-orientador, Prof. Alexandre Rodrigues Silva por ter me guiado na graduação, pela amizade, pelos conselhos, pela dedicação. Pela oportunidade, pelos conhecimentos passados e confiança depositada. Por ter me ensinado a pesquisar e a trabalhar com responsabilidade e ter permitido que esse sonho se realizasse.

Aos Professores: Cláudio Cabral Campelo, pela paciência e ajuda com a estatística e interpretação dos resultados, Ricardo Toniolli e Arlindo de Alencar Araripe Moura por terem aceitado o convite para participar como membros da banca.

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

À ACP Biotecnologia na pessoa do Dr. Nunes Ferreira e Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro pelo fornecimento do diluente ACP-106 C, objeto de estudo deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro.

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

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

Aos companheiros do Laboratório de Reprodução de Carnívoros (LRC): Janaína de Fátima Saraiva Cardoso, Carlos Gabriel de Almeida Dias, Barbara Sucupira Pereira, Cyntia Levi Baratta Monteiro, Victor Madeira, Henna Roberta Quinto, Camila Louise Ackerman, Francisco Tiago Silva Pinheiro, Juliana da Silva Araújo, Luana Azevedo de Freitas, Ricardo Parente Jucá, Carlos Henrique de Andrade Teles, Herlon Victor Rodrigues Silva, em especial a Carla Melo Ferreira (Carlinha), pela ótima convivência, ajuda e momentos de alegria e descontração.

À Ticiane Franco Pereira da Silva (prima), Daniel Couto Uchoa que além de grandes amigos, sempre me apoiaram e me ajudaram no que foi preciso para a realização desta dissertação.

À minha namorada Benília por ter tido paciência comigo, pelo apoio, companheirismo, convivência, enfim por tudo que tem me proporcionado de bom.

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

Faltam palavras para expressar a gratidão, mas muito obrigado mesmo a todos que colaboraram para mais essa conquista na minha vida.

RESUMO

Diversos estudos têm sido desenvolvidos no intuito de melhorar os protocolos já existentes para a congelação de sêmen canino. Com isso o presente trabalho teve dois objetivos: 1) Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de dimetilformamida sobre as características do sêmen canino diluído em água de coco na forma de pó (ACP-106C) e congelado, 2) Comparar o efeito da temperatura de adição da dimetilformamida (27 e 4°C) sobre o sêmen canino diluído em ACP-106 C e congelado. Dez ejaculados oriundos de cinco cães foram coletados por manipulação digital. Para o primeiro experimento, todas as alíquotas foram diluídas em ACP-106C contendo 10% de gema de ovo, sendo que na primeira alíquota utilizou-se como crioprotetor o glicerol 6% (grupo controle-GC), a segunda 2% de dimetilformamida (DF2), a terceira 4% de dimetilformamida (DF4) e a quarta 6% de dimetilformamida (DF6). Já no segundo experimento, uma amostra de sêmen foi diluída em ACP-106 C com 10% de gema de ovo e glicerol a 27°C (G27), a segunda diluída em ACP-106 C com 10% de gema de ovo e dimetilformamida a 27°C (DF27) e a terceira diluída em ACP-106 C com 10% de gema de ovo e dimetilformamida a 4°C (DF4). As amostras dos dois experimentos foram submetidas ao processo de congelação, sendo em seguidas acondicionadas em nitrogênio líquido. Após uma semana, as amostras de sêmen foram descongeladas a uma temperatura de 37° C por 1 minuto, sendo então submetidas às avaliações de morfologia, integridade acrossomal, teste hiposmótico, bem como a análise computadorizada. No primeiro experimento, a motilidade total do GC foi superior à dos grupos contendo dimetilformamida. A população de espermatozoides rápidos, lentos e estáticos foi significativamente maior no GC comparado aos demais grupos. No segundo experimento, foi evidenciada uma superioridade do grupo controle (G27) em relação aos grupos contendo dimetilformamida para os parâmetros motilidade progressiva, VAP, VCL, VSL, LIN, STR e ALH. Diante dos resultados obtidos conclui-se que a dimetilformamida nas concentrações adicionadas ao diluidor ACP-106C e 10% de gema, proporciona resultados *in vitro* considerados insatisfatórios para a congelação do sêmen canino, não sendo indicado seu uso. Além do mais, não há influência da temperatura de adição da dimetilformamida com a utilização do diluidor ACP-106 C, na qualidade do sêmen canino.

ABSTRACT

Several studies have been developed in the intention of already improving the protocols existent for the freezing of canine semen. With that the present work had two objectives: 1) to evaluate the effect of the addition of different dimethylformamide concentrations on the characteristics of the canine semen diluted in coconut water in the powder form (ACP-106C) and frozen, 2) to Compare the effect of the temperature of addition of the dimethylformamide (27 and 4°C) on the canine semen diluted in ACP-106 C and frozen. Ten ejaculated originating from of five dogs were collected by digital manipulation. For the first experiment, all the aliquots were diluted in ACP-106C containing 10% of egg yolk, and in the first aliquot it was used as crioprotetor the glicerol 6% (I group control-GC), Monday 2% of dimethylformamide (DF2), the third 4% of dimethylformamide a (DF4) and Wednesday 6% of dimethylformamide (DF6). Already in the second experiment, a semen sample was diluted in ACP-106 C with 10% of egg yolk and glicerol to 27°C (G27), Monday diluted in ACP-106 C with 10% of egg yolk and dimethylformamide to 27°C (DF27) and the third diluted in ACP-106 C with 10% of egg yolk and dimethylformamide to 4°C (DF4). The samples of the two experiments were submitted to the freezing process, being conditioned soon after in liquid nitrogen. After one week, the semen samples were thawed her/it a temperature of 37° C for 1 minute, being then submitted to the morphology evaluations, integrity acrossomal, test hiposmótico, as well as the computerized analysis. In the first experiment, the total mobility of GC was superior to the one of the groups containing dimethylformamide. The population of spermatozoids fast, slow and static was significantly larger in GC compared to the other groups. In the second experiment, a superiority of the group was evidenced it controls (G27) in relation to the groups containing dimethylformamide for the parameters progressive mobility, VAP, VCL, VSL, LIN, STR and ALH. Before the obtained results it is ended that the dimethylformamide in the concentrations added to the diluidor ACP-106C and 10% of yolk, it provides resulted in vitro considered insatisfatórios for the for freezing of the canine semen, not being indicated your use. Besides, there is not influence of the temperature of addition of the dimethylformamide the use of the diluidor ACP-106 C, in the quality of the canine semen.

Key words: dimethylformamide; powdered coconut water; dog; freezing; semen; cryoprotectant.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	: Porcentagem
$\mu\text{m/s}$	: Micrômetros por segundo
<	: Menor
>	: Maior
$\pm$	: Mais ou menos
$\leq$	: Menor ou igual
$\geq$	: Maior ou igual
$^{\circ}\text{C}$	: Graus Celsius
μm	: Micrômetros
ACP-106 C	: Diluente à base de água de coco em pó formulado para a congelação de sêmen da espécie canina
ACP-106 [®]	: Diluente à base de água de coco em pó formulado para a conservação de sêmen da espécie canina
ACP [®]	: Água de coco em pó
ALH	: <i>Amplitude lateral head</i> (amplitude lateral da cabeça)
ANOVA	: Análise de variância
ATP	: Adenosina tri-fosfato
BCF	: <i>Beat cross frequency</i> (frequência de batimento cruzado)
CASA	: <i>Computer Assisted Semen Analysis</i> (análise de sêmen auxiliada por computador)
CBRA	: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
GC	: Grupo controle
CH3	: Grupo metil
Cm	: Centímetro
CNPq	: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
CV	: Coeficiente de variação
DF2	: Dimetilformamida 2%
DF4	: Dimetilformamida 4%
DF6	: Dimetilformamida 6%
FAVET	: Faculdade de Veterinária
FITC	: Isocianato de Fluoresceína

FUNCAP	: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
G	: Grama
L	: Litro
LIN	: <i>Linearity</i> (linearidade)
LRC	: Laboratório de Reprodução de Carnívoros
mL	: Mililitros
mOsm	: Miliosmol
MP	: Motilidade progressiva
MT	: Motilidade total
PBS	: Tampão salina fosfato
pH	: Potencial hidrogeniônico
PI	: Iodeto de Propídeo
PSA	: Aglutinina de Pisum Sativum
R 123	: Rodamina
SCA	: <i>Sperm Class Analyser</i>
SEM	: Erro padrão das médias
sptz	: Espermatozóide
sptz/mL	: Espermatozóides por mililitro
STR	: <i>Straightness</i> (retilinearidade)
TRIS	: Tris-hidroximetil-aminometano
UECE	: Universidade Estadual do Ceará
v/v	: Volume a volume
VAP	: <i>Velocity average pathway</i> (velocidade média da trajetória)
VCL	: <i>Velocity curvilinear</i> (velocidade curvilínea)
VSL	: <i>Velocity straight line</i> (velocidade progressiva)
μL	: Microlitro

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1** Average sperm morphology, hypoosmotic swelling test, and acrosomal integrity verified by subjective analysis of frozen dog semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide. ($P>0.05$). 57

CAPÍTULO 2

- Figura 1** Média da morfologia espermática, integridade acrossomal, sptz vivos e teste hiposmótico, pós-descongelção através da análise computadorizada submetido a diferentes temperaturas de adição de dimetilformamida ($P>0,05$). 74
- Figura 2** (A) Espermatozóide com lesão na membrana plasmática, acrossoma danificado e com atividade mitocondrial (PI^+ , PSA^+ , $R123^+$), (B) Espermatozóide com membrana plasmática intacta, acrossoma integro e com atividade mitocondrial (PI^- , PSA^- , $R123^+$), (C) Espermatozóide com lesão na membrana plasmática, acrossoma integro e com atividade mitocondrial (PI^+ , PSA^- , $R123^+$). 76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1.	Characteristics (mean $\pm$ SEM) of the sperm fraction in fresh dog semen (n=10 ejaculates).	55
Table 2.	Mean $\pm$ SEM of total motility verified by a subjective analysis of diluted and chilled dog semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide. (P>0.05).	55
Table 3.	Mean $\pm$ SEM of sperm vigor verified by subjective analysis of diluted and chilled dog semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide. (P>0.05).	56
Table 4.	Mean $\pm$ SEM of post-thawing total and progressive motility of sperm verified by computer analysis of dog semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide.	56
Table 5.	Mean $\pm$ SEM of subpopulations of sperm verified by computer analysis of frozen dog semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide.	57
Table 6.	Mean $\pm$ SEM motility end points, measured by CASA of frozen/thawed canine semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide. (P>0.05).	58

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Características (média $\pm$ padrão) da fração espermática do sêmen canino fresco (n=10 ejaculados).	74
Tabela 2.	Média $\pm$ erro médio padrão de motilidade verificados por análise computadorizada do sêmen canino congelado, submetido a diferentes temperaturas de adição de dimetilformamida. (P<0,05).	75
Tabela 3.	Média $\pm$ erro médio padrão das subpopulações espermáticas verificados por análise computadorizada do sêmen canino congelado, submetido a diferentes temperaturas de adição de dimetilformamida (P<0,05).	75
Tabela 4.	Média $\pm$ erro médio padrão do sêmen canino congelado, submetido a diferentes temperaturas de adição de dimetilformamida, marcados pela associação de sondas fluorescentes: PI, FITC-PSA e R123 (P<0,05).	76

SUMÁRIO

RESUMO.....	I	Formatada: Esquerda
ABSTRACT.....	II	Formatada: Esquerda
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	III	
LISTA DE FIGURAS.....	IV	
LISTA DE TABELAS.....	V	Formatada: Esquerda
1. INTRODUÇÃO.....	15	
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16	
2.1. Célula espermática.....	3	
2.2. Congelação do sêmen canino.....	4	
2.3. Avaliação seminal.....	5	
2.4. Meios diluidores.....	13	
2.5. Crioprotetores.....	15	
2.6. Amidas.....	17	
3. JUSTIFICATIVA.....	34	
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	35	
5. OBJETIVOS.....	36	
5.1. Objetivo Geral.....	36	
5.2. Objetivos Específicos.....	36	
6. CAPÍTULO 1. Dimetilformamida como crioprotetor de sêmen canino diluído e congelado em ACP-106C.....	37	
7. CAPÍTULO 2. Diferentes temperaturas de adição da dimetilformamida adicionada ao diluidor ACP-106C para a congelação de sêmen canino.....	60	
8. CONCLUSÕES.....	83	
9. PERSPECTIVAS.....	83	
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84	
11. ANEXOS.....	90	

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biotécnicas da reprodução de cães cresce a cada dia, pela demanda de criadores em guardar as características fenotípicas e genotípicas de um reprodutor, maximizando o uso de material genético de animais de alto valor zootécnico, o que estimula a formação de profissionais especializados nesta área (OLIVEIRA, 2003).

Dentre as diferentes biotécnicas reprodutivas, tem-se destacado a congelação de sêmen, que possibilita o aproveitamento dos ejaculados de um mesmo reprodutor e facilita a propagação deste material genético entre regiões distantes. Diversas metodologias são 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, busca-se minimizar o dano causado ao espermatozóide pelo processamento, visando recuperar um máximo possível de espermatozoides viáveis (CARDOSO *et al.*, 2007).

Ultimamente, tem-se utilizado um diluidor à base de água de coco que contém compostos que mostram atividades semelhantes às daquelas das citocininas e que são derivados das purinas (difeniluréia), possuindo atividades biológicas consideradas excelentes para as células. NUNES & COMBARNOUS (1995) isolaram o ácido 3-indol-acético na água de coco, verificando que esta substância apresentava uma ação benéfica sobre a motilidade dos espermatozoides de caprinos e ovinos incubado a 37°C.

Devido à impossibilidade de armazenamento da água de coco e ainda objetivando a padronização e comercialização do referido diluidor, mesmo naquelas regiões onde o fruto não existe, foi desenvolvida a água de coco na forma de pó (ACP). Este diluente tem demonstrado bons resultados na refrigeração do sêmen de equinos (SAMPAIO-NETO *et al.*, 2002), diluição para inseminação artificial em caprinos (SALGUEIRO *et al.*, 2002), e, em cães, para resfriamento (MADEIRA *et al.*, 2004), inseminação artificial com sêmen a fresco e refrigerado (UCHOA *et al.*, 2004; UCHOA *et al.*, 2007) e congelação do sêmen (CARDOSO *et al.*, 2007).

Ao meio diluidor, devem-se adicionar substâncias crioprotetoras. Segundo ASHWOOD-SMITH (1987) diferentes componentes podem ser usados como crioprotetores penetrantes, como os álcoois: etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol e polietilenoglicol; e também as amidas, incluindo a acetamida, formamida, dimetilformamida e lactamida. Estas substâncias têm estruturas que promovem ligações de hidrogênio com a molécula da água. Estas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo criando um ambiente menos nocivo para as células espermáticas (DALIMATA & GRAHAM, 1997).

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. Ele ocasiona um estresse osmótico à célula espermática, impedindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (WATSON, 2000). Apesar de seu efeito protetor, o glicerol apresenta certa toxicidade para as células espermáticas durante a sua adição e durante a própria criopreservação. FAHY *et al.* (1990) relatam que esta toxicidade pode resultar em desnaturação de proteínas, alteração de interações da actina na membrana plasmática e indução da liberação das proteínas do seu local na membrana.

Nesse sentido as amidas têm sido utilizadas como crioprotetores alternativos em diferentes espécies como cães (ZIMMERMAM *et al.*, 2007; FUTINO 2008; Lopes *et al.*, 2009), coelhos (HANADA & NAGASE, 1980; KASHIWAZAKI *et al.*, 2006), galos (CHALAH *et al.* 1999; TSELUTIN *et al.* 1999; LUKASZEWICK 2002) peixes (JOHNSON & LARSSON, 1985), equinos (ALVARENGA *et al.*, 2005) e suínos (BIANCHI *et al.*, 2008). Porém, com relação ao diluente à base de água de coco, o efeito de sua interação com a dimetilformamida, utilizada como crioprotetor, é desconhecido para o sêmen não apenas de cães, mas de qualquer outra espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Célula espermática

O espermatozóide é uma célula altamente especializada responsável em executar a função exclusiva de fertilizar um oócito e é usualmente dividido em cabeça, peça intermediária e peça terminal (AMANN & PICKETT, 1987). A cabeça tem a função primordial de promover a penetração no oócito, levando toda a informação genética contida nela. A cauda contém a máquina metabólica responsável pela produção de energia e pelo mecanismo da motilidade espermática (PINEDA, 1989).

Os espermatozóides são formados dentro dos túbulos seminíferos, caracterizando-se por serem células alongadas. São todos recobertos pelo plasmalema ou membrana plasmática. O acrossoma é uma estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo que contém várias enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fertilização, incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas. O colo conecta a cabeça do espermatozóide à cauda, que é subdividida em peça intermediária, principal e terminal (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

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

Congelação do sêmen canino

As razões para a utilização do sêmen congelado em cães são inúmeras e incluem a possibilidade de transporte do sêmen para longas distâncias e o seu armazenamento por tempo indeterminado. Adicionalmente, a congelação permite a diminuição de gastos, que ocorrem com a necessidade de exportação de um animal. Evita-se ainda, o envio da fêmea para o local onde está o macho, o que é um procedimento desgastante e

pode refletir negativamente na eficiência reprodutiva da fêmea, além dos riscos sanitários (LINDE-FORSBERG e FORSBERG, 1989).

A congelação é o método pelo qual o sêmen, e consequentemente, o potencial genético de machos valiosos, pode ser mantido por tempo indeterminado. A meta final na preservação de sêmen é a de obter gestações após inseminação artificial tão eficientemente como após a monta natural (QUINTANILHA, 1994).

O maior problema com relação à congelação de sêmen é que mesmo utilizando as melhores técnicas, o padrão de sobrevivência pós-descongelação é restrito em cerca de 50% da população espermática (WATSON, 1995). O processo de congelação também causa danos às membranas espermáticas. Geralmente, as membranas afetadas são a plasmática, a acrossomal externa e a mitocondrial. A desestabilização da membrana plasmática após a congelação assemelha-se a uma capacitação fisiológica do espermatozóide. O espermatozóide capacitado e/ou com acrossomo reagido tem uma vida limitada, reduzindo assim a fertilidade (WATSON, 1995; JANUSKAUSKAS *et al.*, 1999).

As mudanças bruscas de temperatura durante os processos de congelação e descongelação alteram a organização dos componentes estruturais da membrana plasmática, afetando as suas propriedades. Essas alterações estão associadas a mudanças na permeabilidade e na habilidade de sofrer fusão. Além disso, os espermatozóides podem apresentar edemas e rupturas na membrana plasmática e acrossomal externas, alterações na fluidez da membrana, desregularização no influxo de cálcio intracelular e alterações na atividade enzimática (JANUSKAUSKAS *et al.*, 1999).

A congelação pode produzir uma sub-população com menor tempo de vida *in vivo*, reduzindo efetivamente a eficiência da população como um todo. Após a congelação, os espermatozóides sobreviventes contêm mais cálcio intracelular que antes, refletindo em dano à membrana no mecanismo de permeabilidade seletiva (BAILEY *et al.*, 2000).

De acordo com MAZUR (1984), as mudanças celulares que ocorrem durante a congelação não estão associadas à sua habilidade de se armazenarem em temperaturas muito baixas, mas sim à sua letalidade em uma zona de temperatura intermediária (-

15°C a -60°C), que a célula atravessa duas vezes; uma durante a congelação e outra durante a descongelação. Nenhuma reação térmica ocorre em um sistema aquoso à temperatura de nitrogênio líquido (-196°C). Uma explicação para isso é que não existe água líquida ao redor da temperatura de -130°C. O único estado físico que existe são os cristais e nesse estado a viscosidade é alta e a difusão insignificante; portanto a -196°C não há energia térmica para reação química (MCGEE *et al.*, 1962).

As únicas reações que podem ocorrer em um sistema aquoso congelado a -196°C são eventos fotofísicos como a formação de radicais livres e a produção de macromoléculas que se quebram como resultado direto do impacto pelas radiações ionizantes. Entretanto, a dose de radiação ionizante requerida para causar injúrias nas células levaria de 2.000 a 4.000 anos para causar este efeito (WATSON, 2000).

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

Avaliação seminal

Imediatamente após a obtenção do sêmen, este deve ser avaliado, com base em parâmetros macroscópicos, como cor e volume, e parâmetros microscópicos como motilidade, concentração, morfologia, e funcionalidade de membrana. A avaliação morfológica é essencial para se determinar a qualidade do sêmen (ZAMBELLI; CUNTO, 2006). Entretanto, a avaliação desses parâmetros não comprova a fertilidade animal. Desse modo, é sugestiva a realização de diversas avaliações conjuntamente, dentre as quais podem ser destacadas:

Motilidade espermática

A avaliação da motilidade espermática considera a porcentagem de espermatozóides móveis e sua intensidade de movimento (DERIVAUX, 1980). Segundo Seager e Fletcher (1972), a avaliação da motilidade espermática deve ser feita imediatamente após a colheita ou descongelação do sêmen, com o auxílio da microscopia óptica. Em seguida, deve-se avaliar o vigor espermático, por meio da intensidade do movimento dos espermatozóides. Classificando numa escala de 0 a 5 (PLATZ; SEAGER, 1977; CHRISTHIANSEN, 1988).

A avaliação desses parâmetros por meio 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 qualificação do avaliador, levando a uma alta variabilidade entre os laboratórios (IGUER-OUADA; VERSTEGEN, 2001). A análise computadorizada (CASA) foi proposta pra suplantar o obstáculo de subjetividade nas análises de sêmen e vem sendo utilizada em diversas espécies animais, incluindo a canina (SILVA, 2005).

Apesar da avaliação da motilidade espermática não poder ser usada como uma mensuração dos espermatozóides vivos e mortos na amostra, ela fornece a informação de um fator que é necessário para a capacidade fertilizante do espermatozóide, pois a motilidade é a manifestação da sua competência estrutural e funcional (PEÑA MARTINEZ, 2004).

Morfologia espermática

Várias classificações foram descritas para a morfologia espermática. (DERIVAUX, 1980) sugere a classificação das alterações morfológicas espermáticas em: primária, quando relacionadas a problema oriundo na gametogênese e secundária, quando diz respeito a maturação espermática no epidídimo, ou em consequência da manipulação do sêmen, como diluição, resfriamento, congelação ou descongelação. Segundo Cardoso *et al.* (2005), alterações secundárias têm pouca interferência sobre a fertilidade, quando comparadas às primárias. Porém, é importante enfatizar que a microscopia de luz não permite a visualização de danos na ultra-estrutura espermática,

sendo aconselhável o emprego de outras técnicas como a microscopia eletrônica (SILVA *et al.*, 2006).

Para realização da avaliação morfológica, destaca-se o uso do corante Rosa de Bengala (RODRIGUES, 1997) que permite não apenas a visualização da morfologia espermática, mas também a avaliação da integridade do acrossoma e o corante Azul de Bromofenol (LIMA *et al.*, 2007) que permite a contagem de espermatozóides vivos e mortos.

Funcionalidade da membrana espermática

O teste hiposmótico avalia a funcionalidade da célula espermática (SPITTALER; TYLER, 1985), sendo essa importante para o metabolismo celular. A resposta osmótica do sêmen fresco estaria correlacionada com a fertilidade em bovinos (REVELL; MRODE, 1994), javali (PEREZ-LLANO *et al.*, 2001). Nos cães, a correlação da resposta osmótica com a fertilidade *in vivo* ou *in vitro* ainda não foi estabelecida (PEÑA-MARTINEZ, 2004).

Análise de sêmen auxiliada por computador (CASA)

Nas últimas décadas, diversos sistemas de análises de sêmen auxiliado por computador (CASA) têm sido propostos e aplicados na tentativa de aumentar a acurácia da avaliação convencional do sêmen, além de incrementar o estudo da andrologia (TARDIF *et al.*, 1997; VERSTEGEN *et al.*, 2002; AMANN & KATZ, 2004).

CASA refere-se a um sistema automatizado (*hardware e software*) que visualiza e digitaliza imagens sucessivas dos espermatozóides móveis. Estes são posteriormente identificados em imagens que são analisadas e, desta forma, obtêm-se o estabelecimento de sua trajetória, fornecendo informações precisas e significativas da cinética das células (FARREL *et al.*, 1998). Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozóide (QUINTERO-MORENO *et al.*, 2003).

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é de grande interesse devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (FARREL *et al.*, 1998; ARRUDA *et al.*, 2007).

Apesar do seu alto custo, o sistema CASA oferece automatismo, rapidez e objetividade nas avaliações, possibilitando detalhar melhor a qualidade do sêmen analisado, fornecendo assim, informações e detalhes adicionais sobre as características de movimentação dos espermatozoides (FARREL *et al.*, 1998; SOUSA, 2007).

De modo geral, os parâmetros da cinética espermática avaliados pelo CASA (SOUSA, 2007) são:

- Motilidade total (MT) - É a razão das células móveis no total de espermatozoides da amostra (%).
- Motilidade progressiva (MP) - É a razão das células móveis com movimento progressivo no total de espermatozoides da amostra (%).
- Velocidade média da trajetória (VAP)- É a indicação da trajetória geral do espermatozoide, sendo a velocidade média ininterrupta do caminho da célula ($\mu\text{m/s}$).
- Velocidade progressiva (VSL) - Considera a trajetória espermática como uma reta. É a velocidade média percorrida em linha reta entre o início e o final do percurso ($\mu\text{m/s}$).
- Velocidade curvilínea (VCL) - É a velocidade do deslocamento real dos espermatozoides, ou seja, é a velocidade média de cada ponto atual do trajeto seguido por cada célula ($\mu\text{m/s}$).
- Amplitude lateral da cabeça (ALH)- Corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento (μm).
- Frequência de batimento cruzado (BCF) – Visa fornecer indicações da frequência do batimento. É definida como a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido (Hz).

- Retilinearidade (STR) - É a medida do afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta (uma comparação da linha reta com a média dos caminhos) (%).

- Linearidade (LIN) - É a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta (comparação da linha reta e os caminhos curvilíneos) (%).

De acordo com ARRUDA (2000), para os parâmetros motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL, BCF, STR, LIN e RAPID, quanto maior for o valor numérico obtido, melhor deverá ser a qualidade espermática, e, opostamente, para o parâmetro ALH, quanto maior valor numérico obtido, pior a qualidade espermática.

Sondas fluorescentes

Os espermatozóides são constituídos por vários compartimentos inclusos dentro da membrana plasmática. Essas membranas devem permanecer intactas e funcionais para permitir a competência celular, sendo essenciais à proteção, ao funcionamento celular e ao processo de fertilização (SOUSA, 2007).

Avanços recentes na microscopia de fluorescência têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies (GARNER & JOHNSON, 1995; ARRUDA, 2000; ARRUDA & CELEGHINI, 2003; CELEGHINI, 2005). A funcionalidade ou integridade das estruturas dos espermatozóides é monitorada por sondas fluorescentes (ou fluorocromos), as quais possuem a capacidade de se ligar e marcar estruturas específicas das células, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, dependendo de suas características físicas (CELEGHINI, 2005). Apesar do alto custo, elas podem fornecer informações precisas sobre os compartimentos e estado funcional dos espermatozóides, uma vez que a fluorescência é um indicador sensível do estado de certas moléculas, sendo aplicado como um meio de medir mudanças metabólicas dentro de células vivas (CELEGHINI, 2005).

Uma variedade de sondas tem sido utilizada na avaliação dos diferentes componentes celulares e a maioria dos testes, que foram desenvolvidos nos últimos anos com esse objetivo, permitem analisar diferentes aspectos da função espermática como a

integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (GRAHAM *et al.*, 1990; MAXWELL *et al.*, 1997; ARRUDA, 2000; CELEGHINI *et al.*, 2007).

Na avaliação de membranas plasmáticas, a integridade da mesma é essencial para a manutenção da viabilidade espermática (PAPAIOANNOU *et al.*, 1997), por ser responsável pelo mecanismo de manutenção de equilíbrio osmótico, atuando como uma barreira seletiva entre os meios intra e extracelular. Danos nesta estrutura podem levar à perda da homeostase com posterior morte celular e, *in vivo*, um espermatozóide com a membrana plasmática afuncional torna-se incapaz de realizar a fertilização (SILVA e GADELLA, 2006).

A integridade da membrana plasmática é usualmente verificada por fluorocromos específicos para DNA que são impermeáveis às membranas intactas. Portanto, são marcadas apenas células com membrana plasmática lesada, podendo ser consideradas vivas as células que são capazes de excluir essas sondas. De acordo com ARRUDA *et al.* (2007), várias sondas com esse princípio têm sido testadas nos espermatozóides.

Como exemplo, o brometo de etídio (HALANGK *et al.*, 1984); corantes supravitais Hoechst 33258 e Hoechst 33342 (CASEY *et al.*, 1993; MAXWELL *et al.*, 1997; JANUSKAUSKAS *et al.*, 2001); SYBR-14 (GARNER *et al.*, 1999; THOMAS *et al.*, 1998); diacetato de carboxifluoresceína (HARRISON & VICKERS, 1990; PEÑA *et al.*, 1998; SOUZA, 2001; VALCÁRCEL *et al.*, 1994); e iodeto de propídio (PI) (ARRUDA, 2000; ARRUDA *et al.*, 2003; GRAHAM *et al.*, 1990; MAXWELL *et al.*, 1997; CELEGHINI, 2005; CHIRINÉIA, 2008).

Por ser um fluorocromo muito estável, o PI tem apresentado êxito nos resultados tanto com o sistema de citometria de fluxo para contagem de células, quanto em microscopia de epifluorescência (CELEGHINI, 2005), marcando em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada devido à sua afinidade ao DNA (PAPAIOANNOU *et al.*, 1997). Além disso, esta sonda vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de aplicação da técnica e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou associada a outro marcador fluorescente para avaliar membrana plasmática (ARRUDA *et al.*, 2007).

O acrossomo é uma grande organela preenchida com enzimas hidrolíticas. A ligação inicial do espermatozóide com a zona pelúcida do oócito tem como objetivo a reação acrossomal, resultando na liberação e ativação das enzimas acrossomais (JAISWAL *et al.*, 1999; SILVA e GADELLA, 2006) que são fundamentais para que ocorra a fecundação. Portanto, a avaliação da integridade acrossomal antes dos processos de reprodução assistida vem sendo cada vez mais empregada, visto que a integridade do acrossoma é um aspecto fundamental para a fertilização (SILVA e GADELLA, 2006).

Muitas técnicas de coloração têm sido usadas com relativo sucesso para se determinar a porcentagem de espermatozoides que sofreram reação acrossomal (*status* acrossomal) como, por exemplo, as que empregam os corantes Azul de Trypan/Giemsa (KOVÁCS & FOOTE, 1992; COSTA, 2000; RESENDE, 2007), *Chicago Sky Blue* (KÚTVÖLGYI *et al.*, 2006) e técnicas que utilizam lectinas conjugadas a fluoresceína (FARLIN *et al.*, 1992; VALCÁRCEL *et al.*, 1997; ARRUDA, 2000; CELEGHINI, 2005).

O caráter glicoproteico dos componentes acrossomais fornece um meio de mensurar a integridade do acrossoma, por preenchimento da matriz acrossomal de espermatozoides que apresentem acrossomo lesado, com lectinas conjugadas como, por exemplo, a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA). A PSA se liga de forma específica a carboidratos das glicoproteínas (glicoconjugados) presentes na matriz acrossomal, ou seja, esta aglutinina possui afinidade por resíduos glicoprotéicos específicos, se associando desta forma, a açúcares α -manosídeos encontrados nos conteúdos acrossomais (CELEGHINI, 2005).

Para a visualização do acrossomo espermático em microscopia de epifluorescência, a PSA deve ser conjugada a fluoresceínas, tais como o isotiocionato de fluoresceína (FITC) (CELEGHINI, 2005). Assim, o acrossomo lesionado é marcado com sucesso, emitindo uma coloração verde-amarelada, o que facilita sua visualização e identificação. Portanto, a ausência da fluorescência é indicativo de células com o acrossomo intacto, e a fluorescência evidencia lesões ou reação acrossomal (SILVA & GADELLA, 2006).

A FITC-PSA tem sido utilizada para avaliar integridade do acrossomo em bovinos (GRAHAM *et al.*, 1990; FARLIN *et al.*, 1992; MENDOZA *et al.*, 1992; CASEY *et al.* 1993; ARRUDA, 2000; ARRUDA & CELEGHINI, 2003; ARRUDA *et al.*, 2003; CELEGHINI, 2005; CELEGHINI *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2007; ARRUDA *et al.*, 2007; CELEGHINI *et al.*, 2007; CHIRINÉIA, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Comprovando a eficiência e especificidade do FITC-PSA na avaliação da integridade de membrana acrossomal, SOUZA (2001) comparou quatro diferentes técnicas para exame da membrana acrossomal para amostras de sêmen equino pós-descongelamento. Os testes realizados foram: câmara úmida por microscopia de contraste de fase e de interferência diferencial, coloração por Azul de Trypan /Giemsa e microscopia de epifluorescência, utilizando como marcador o FITC-PSA. Verificou-se que a técnica de microscopia de epifluorescência com a sonda fluorescente FITC-PSA foi a mais eficiente em detectar lesões de acrossomo.

As mitocôndrias espermáticas estão localizadas na peça intermediária do espermatozóide e sua principal função é realizar a fosforilação oxidativa e produzir ATP. A membrana mitocondrial interna é o local de produção dessa energia metabólica, sendo essencial para o batimento flagelar, possibilitando a propulsão (AUGER *et al.*, 1989; CELEGHINI, 2005; SILVA & GADELLA, 2006; SOUSA, 2007) e a penetração do espermatozóide no oócito. Portanto, a mitocôndria tem papel fundamental na motilidade e, segundo MARCHETTI *et al.* (2004), a análise da função mitocondrial pode oferecer uma maneira de acessar a motilidade espermática.

O potencial de membrana mitocondrial interno é gerado pela cadeia respiratória e coordena a síntese de ATP mitocondrial. A capacidade para monitorar mudanças no potencial de membrana em mitocôndrias dentro das células pode ser crucial para a interpretação de mudanças na fisiologia celular em várias situações experimentais (DUCHEN *et al.*, 1993).

Muitos indicadores para o monitoramento do potencial de membrana de mitocôndrias têm sido discutidos, havendo grande ênfase em favor das sondas fluorescentes, mais especificamente as rodaminas e as carbocianinas. O sucesso para o

uso dessas sondas em células vivas é baseado no fato de não serem destrutivas nem causarem toxicidade (REERS *et al.*, 1991).

Desta forma, este marcador fluorescente vem sendo utilizado com sucesso para estimar o potencial de membrana mitocondrial, em diferentes espécies como na espécie canina (CHIRINÉIA, 2008), humana (TROIANO *et al.*, 1998); bovina (GARNER *et al.*, 1997; THOMAS *et al.*, 1998; CELEGHINI *et al.*, 2007), equina (GRAVANCE *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2008), ovina (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2004) e suína (ANDRADE *et al.*, 2007).

Meios diluidores

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

Diferentes meios diluidores têm sido testados e utilizados, como os diluidores à base de glicina-gema, leite desnatado, tampão tris (SILVA, 2005), diluidor à base de água de coco e diluidor à base de água de coco na forma de pó (CARDOSO, 2005). Além destes, muitas empresas desenvolvem seus próprios diluidores como o Triladyl, Laichipos 478, Biociphos W482 e o CLONE (OLIVEIRA, 2003).

O meio diluidor de sêmen deve conter propriedades que impeçam as mudanças nocivas de pH; proteger a membrana espermática contra choque térmico durante o resfriamento; conter nutrientes como fontes de energia; prevenir o crescimento de bactérias; manter pressão osmótica fisiológica e concentração de eletrólitos adequada; crioprotetores para reduzir os danos da congelação (CONCANNON e BATTISTA, 1989)

Para a composição do diluente, é ainda necessária a adição de gema de ovo, que protege a membrana plasmática da célula espermática, restaurando os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre

durante o resfriamento inicial do sêmen (WATSON; 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). Para o sêmen do cão, a maioria dos autores utiliza concentrações de gema em torno de 20% no diluente (FARSTAD; ANDERSEN, 1975; LINDE-FORSBERG; FORSBERG, 1989; SILVA, 2001; MARTINS, 2005).

Atualmente, tem-se utilizado principalmente o diluente Tris para a congelação de sêmen canino, pois o mesmo mostra-se superior a outros diluentes (FARSTAD, 1996; SILVA *et al.*, 2000). O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano - $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) não apenas apresenta atividade tamponante, mas também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação de sua energia (RODRIGUES, 1997).

Entretanto diversos estudos têm sido conduzidos com a água de coco (NUNES *et al.*, 2005). Tendo um grande interesse em seu uso como meio diluidor, sendo utilizado para a diluição do sêmen de diversas espécies como equinos (SAMPAIO-NETO *et al.*, 2002), diluição para inseminação artificial em caprinos (SALGUEIRO *et al.*, 2002), e em cães para resfriamento (MADEIRA *et al.*, 2004), inseminação artificial com sêmen a fresco e refrigerado (UCHOA *et al.*, 2004; UCHOA *et al.*, 2007) e congelação do sêmen (CARDOSO *et al.*, 2007)

Devido à impossibilidade de armazenamento da água de coco e ainda objetivando a padronização e comercialização do referido diluidor, mesmo naquelas regiões onde o fruto não existe, foi desenvolvida a água de coco na forma de pó (ACP®). Este diluente tem demonstrado bons resultados na refrigeração do sêmen de equinos (SAMPAIO-NETO *et al.*, 2002), diluição para inseminação artificial em caprinos (SALGUEIRO *et al.*, 2002), e em cães para resfriamento (MADEIRA *et al.*, 2004), inseminação artificial com sêmen a fresco e refrigerado (UCHOA *et al.*, 2004; UCHOA *et al.*, 2007) e congelação do sêmen (CARDOSO *et al.*, 2007).

Crioprotetores

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio diluidor para promover a desidratação, ou seja, evitar a formação de gelo intracelular na célula espermática durante o congelamento e permitir que a célula se rehidrate adequadamente durante o descongelamento. As características físico-químicas ideais que um agente crioprotetor deve possuir são as seguintes: baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquosa e principalmente, baixa toxicidade celular (NASH, 1966).

Os agentes crioprotetores são classificados em penetrantes e não penetrantes (NASH, 1966; ROWE, 1966) à membrana citoplasmática. Os crioprotetores não penetrantes são representados por macromoléculas com alto peso molecular, tais como os açúcares, lipoproteínas da gema do ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos, sendo estas substâncias responsáveis por um mecanismo de proteção no meio extracelular (AMAN & PICKETT, 1987).

Os crioprotetores penetrantes exercem seu mecanismo de ação tanto no meio extracelular, quanto no meio intracelular e desempenham importante função no processo de congelação. Estas substâncias possuem um mecanismo de ação específico por suas propriedades coligativas, ou de ligação com a molécula de água que tem suas características modificadas. Durante o processo de congelamento o crioprotetor permeável limita a formação, retarda a expansão dos cristais de gelo e reduz as concentrações de soluto no meio extra e intracelular (NASH, 1966; ROWE, 1966).

ASHWOOD-SMITH (1987) resumiu diferentes componentes tais como alcoóis: etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol, polietilenoglicol, dimetilsulfóxido e também as amidas, dentre elas a dimetilformamida, como substâncias que podem ser usadas como agentes crioprotetores para o congelamento de sêmen.

Entre os crioprotetores penetrantes o glicerol é o mais frequentemente utilizado como agente crioprotetor do espermatozóide desde a demonstração da sua eficácia (SMITH & POLGE *et al.*, 1950), e têm ação tanto intracelular como extracelular na proteção das estruturas celulares. O seu efeito protetor é atribuído a sua propriedade coligativa ou de ligação com a água (SALOMON & MAXWELL, 1995). Também aumenta o volume de canais de solventes descongelados, dilui as altas concentrações de

sais (SQUIRES *et al.*, 1999) e diminui a pressão osmótica do meio resfriado (SALAMON & MAXWELL, 1995).

Apesar de o glicerol ser o crioprotetor mais utilizado nos diluidores de congelação do sêmen de diversas espécies, alguns autores afirmam que a sua atividade crioprotetora sobre o espermatozóide é prejudicada pelo seu efeito negativo sobre a viabilidade e fertilidade pós-descongelação (FAHY, 1986). Seus efeitos deletérios aos espermatozoides incluem estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e permeabilidade da membrana plasmática, assim como desorganização da sua composição lipídica (WATSON, 1995).

Com o declínio constante da temperatura, as células estarão expostas à temperatura de congelação (abaixo de 0°C), e com isto, as células espermáticas serão expostas a alterações de osmolaridade do meio que as circunda. A água presente no meio extracelular encontra-se sob a forma de solução, com a congelação de parte desta água, a saturação de solutos aumenta, tornando hipertônico o meio externo. Neste momento, para que um equilíbrio osmótico seja atingido, ocorre um efluxo de água da célula a ser congelada para o meio externo. Esta tentativa da célula em equilibrar o meio que a circunda pode levá-la a sofrer um efeito deletério devido a grande desidratação e a exposição a um meio extremamente saturado. Este efeito é chamado de Efeito de Solução e é considerado um dos pontos críticos no processo de congelação das células espermáticas (MAZUR *et al.*, 1972; WATSON, 1981; WATSON, 1995; HOLT, 2000).

Outros crioprotetores penetrantes têm sido estudados para congelar o sêmen de mamíferos domésticos, como os crioprotetores da função química álcool: propilenoglicol, etanol, metanol e alguns da função química amida: acetamida, metilacetamida, dimetilacetamida, formamida, metilformamida, dimetilformamida, lactamida e butiramida (BITTENCOURT, 2006).

Alguns crioprotetores penetrantes como a acetamida têm desempenhado efeito crioprotetor satisfatório durante a congelação de sêmen de coelho, uma espécie considerada de difícil congelabilidade (KASHIWAZAKI *et al.*, 2006). Outros como a metilacetamida e a dimetilformamida têm demonstrado excelente efeito protetor aos

espermatozóides congelados de equinos, sendo alternativas promissoras para a congelação de sêmen de garanhões considerados maus congeladores (KEITH, 1998; ALVARENGA *et al.*, 2000; ALVARENGA *et al.*, 2002; SNOECK, 2003).

KEITH *et al.* (1998) compararam o efeito crioprotetor do glicerol, etilenoglicol, acetamida, metilacetamida, formamida, metilformamida e dimetilformamida sobre a motilidade espermática de espermatozóides equinos, observaram melhores resultados de motilidade progressiva pós-descongelamento no sêmen congelado com o glicerol seguido da metilformamida e dimetilformamida.

Segundo a revisão sobre a utilização das amidas na congelação do sêmen equino feita por ALVARENGA *et al.* (2005), a dimetilformamida é a que tem promovido melhores índices de congelabilidade do sêmen dessa espécie, como também, quando comparado com o glicerol, tem obtido melhores taxas de fertilidade.

As amidas podem representar alternativas promissoras também para o congelamento de sêmen cães (OLIVEIRA, 2003), Pois apresentam três sítios de ligação de hidrogênio com a molécula de água, a metade em comparação ao glicerol. No entanto, por possuírem menor viscosidade e solubilidade à água em relação ao glicerol, permitem maior permeabilidade da membrana (NASH, 1966) diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causados pelos crioprotetores (BALL & VO, 2001).

Amidas

As amidas são crioprotetores penetrantes derivados dos ácidos carboxílicos e aminas, que apresentam três sítios de ligação de hidrogênio com a molécula de água, a metade em comparação ao glicerol. No entanto, por possuírem menor viscosidade, baixo peso molecular e solubilidade à água, também são menos tóxicas em relação ao glicerol permitindo assim maior permeabilidade da membrana (NASH, 1966) diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causados pelos crioprotetores (BALL & VO, 2001).

Segundo BIANCHI *et al* (2008) as amidas são altamente lipofílicas devido a incorporação do grupamento metil (CH₃) que aumentam a permeabilidade da membrana. Além disso, também são de natureza hidrofílicas, permitindo assim uma maior interação com a água fazendo com que ocorra uma redução na formação de cristais de gelo intracelular.

Com isso podem representar alternativas promissoras também para o congelamento de sêmen em diversas espécies como cães (ZIMMERMAM *et al.*, 2007; FUTINO 2008), coelhos (HANADA & NAGASE, 1980; KASHIWAZAKI *et al.*, 2006), galos (CHALAH *et al.* 1999; TSELUTIN *et al.*1999; LUKASZEWICK 2002) peixes (JOHNSON & LARSSON, 1985), equinos (ALVARENGA *et al.*, 2005) e suínos (BIANCHI *et al.*, 2008) em substituição ao glicerol, com possibilidade de minimizar a variabilidade individual de congelabilidade entre ejaculados de um mesmo animal e com isso melhorar os resultados de fertilidade após descongelamento.

Assim como acetamida, metilacetamida e dimetilformamida têm demonstrado excelente efeito protetor aos espermatozóides congelados de equinos, sendo alternativas promissoras para a congelação de sêmen de garanhões considerados maus congeladores (KEITH, 1998; ALVARENGA *et al.*, 2000; ALVARENGA *et al.*, 2002; SNOECK, 2003).

MEDEIROS *et al.* (2002), compararam o efeito crioprotetor da dimetilacetamida, metilformamida e dimetilformamida e suas combinações com o glicerol, obtendo melhores resultados *in vitro* com a dimetilformamida isolada. Este fato indica que as amidas parecem proteger melhor a célula espermática do garanhão quando comparado ao uso glicerol. Também sendo possível utilizar em garanhões que apresentam resultados insatisfatórios com uso do glicerol (GOMES *et al.* 2002; SQUIRES *et al.*2004; CARMO *et al.* 2005).

Já BIANCHI *et al* (2008) em estudo realizado com suínos observaram que a dimetilacetamida e dimetilformamida podem ser utilizadas em substituição ao glicerol nesta espécie, pois obtiveram resultados pós descongelação superiores tanto para motilidade como integridade de membrana.

FUTINO *et al* (2008), utilizando dimetilformamida a 3% no meio Tris gema com sêmen de cão, obteve valores de motilidade progressiva superiores aos descritos por Zimmermann *et al.* (2007), que utilizaram uma concentração de 3,5% também em meio Tris gema, entretanto foram inferiores a 7% de dimetilformamida. Já Oliveira (2003) utilizando 5% de dimetilformamida obteve motilidade progressiva de 45,5% pós-descongelção, vale ressaltar que este autor utilizou o meio lactose-gema.

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, presencia-se em todo o mundo um imenso desenvolvimento de biotecnologias aplicadas à reprodução dos carnívoros domésticos. Aliado a isso, o diluidor ACP-106 C apresenta um grande potencial de uso em escala comercial para a implantação de bancos de sêmen canino. Entretanto, deve-se sempre buscar aprimorar sua utilização. Verifica-se assim, que ainda existem poucos trabalhos acerca da utilização da dimetilformamida para congelação de sêmen de cães e nenhum estudo utilizando o diluidor ACP-106 C, associado a esse crioprotetor. Desta forma, o aperfeiçoamento desse protocolo de congelação de sêmen canino poderá ser utilizado em escala comercial, uma vez que é crescente o número de criadores comerciais de cães interessados no armazenamento e subsequente difusão de material genético de seus animais, podendo proporcionar um incremento nos resultados de congelação de sêmen, particularmente para aqueles cães cujos ejaculados apresentam maior susceptibilidade aos efeitos tóxicos do glicerol. Desse modo, a presente proposta visa preencher a lacuna acerca da adição da dimetilformamida, como um crioprotetor alternativo a ser adicionado ao diluidor ACP-106 C, para a congelação do sêmen de cães.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- A adição do ACP-106 C com dimetilformamida ao sêmen canino, em diferentes concentrações confere resultados pós-descongelção semelhante ou superiores aos do glicerol.

- A adição da dimetilformamida a uma temperatura de 4°C permitirá a adequada conservação da célula espermática possibilitando uma melhor atividade crioprotetora dessa substância.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da adição da dimetilformamida ao diluente ACP-106 C sobre as características do sêmen canino congelado.

5.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de dimetilformamida adicionada ao ACP-106 C sobre o sêmen canino congelado.

Estudar o efeito da temperatura de adição da dimetilformamida ao diluente ACP-106 C sobre as características do sêmen canino congelado.

Comparar o crioprotetor dimetilformamida e glicerol adicionadas ao diluente ACP-106 C sobre as características do sêmen canino congelado.

6. CAPÍTULO 1

Artigo 1: Artigo submetido em 06 de outubro de 2009 ao periódico “*Animal Reproduction Science*”, qualificado como A2 no último QUALIS da Medicina Veterinária.

Dimethylformamide as a cryoprotectant for dog semen diluted and frozen in ACP-106C

(Dimetilformamida como crioprotetor de sêmen canino diluído e congelado em ACP-106C)

Antonio Cavalcante Mota Filho¹, Carlos Henrique de Andrade Teles¹, Ricardo Parente Jucá¹, Janaina de Fátima Saraiva Cardoso¹, Daniel Couto Uchoa¹, Cláudio Cabral Campello², Lúcia Daniel Machado da Silva^{1*}

¹Laboratory of Carnivore Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine /State University of Ceara.

²LAMOFOPA, Faculty of Veterinary, State University of Ceará
1700, Paranjana Avenue

Campus do Itaperi, CEP 60740-903, Fortaleza, CE, Brazil

* Corresponding author: lucia.daniel.machado@hotmail.com

Phone number: 00 55 ** 85 3101-9854

Fax number: 00 55 ** 85 3101-9840

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de dimetilformamida sobre as características do sêmen canino diluído em água de coco na forma de pó (ACP-106C) e congelado. Dez ejaculados oriundos de cinco cães foram coletados por manipulação digital. A fração rica em espermatozóide foi avaliada e dividida em quatro alíquotas. Todas as alíquotas foram diluídas em ACP-106C contendo 10% de gema de ovo, sendo que na primeira alíquota utilizou-se como crioprotetor o glicerol 6% (grupo controle-GC), a segunda 2% de dimetilformamida (DF2), a terceira 4% de dimetilformamida (DF4) e a quarta 6% de dimetilformamida (DF6). Todas as diluições ocorreram a uma temperatura de 27°C. As amostras foram submetidas ao processo de congelação, sendo em seguida acondicionadas em nitrogênio líquido. Após uma semana, as amostras de sêmen foram descongeladas a uma temperatura de 37° C por 1 minuto, sendo então submetidas às avaliações de morfologia, integridade acrossomal, teste hiposmótico, bem como a análise computadorizada. Os dados foram submetidos à ANOVA, seguido do teste *t* de Student ($P<0,05$). Na análise computadorizada, foi evidenciada diferença significativa para a motilidade total, sendo o grupo controle $52,3 \pm 4,5$ superior em relação aos outros grupos $20,5 \pm 4,5$ (DF2), $24,9 \pm 4,5$ (DF4) e $25,5 \pm 4,5$ (DF6) ($P<0,05$). A população de espermatozoides rápidos lentos e estáticos foi significativamente maior no GC comparado aos demais grupos (G2, G4 e G6). Diante dos resultados obtidos conclui-se que a dimetilformamida nas concentrações testadas no presente trabalho adicionadas ao diluidor ACP-106C e 10% de gema, proporciona resultados *in vitro* considerados insatisfatórios para a para congelação do sêmen canino, não sendo indicado seu uso.

Palavras-chave: dimetilformamida, água de coco em pó, cão, congelação, sêmen.

ABSTRACT

The objective of this study was to assess the effect of adding different concentrations of dimethylformamide on the characteristics of dog semen diluted in powdered coconut water (ACP-106C) and frozen. Ten ejaculates were collected from five dogs by manual stimulation. The spermatozoa rich-fraction of the ejaculates was evaluated and divided into four aliquots. All aliquots were diluted in ACP-106C containing 10% egg yolk. The cryoprotectants used in each aliquot were as follows: glycerol 6% in the first aliquot (control group-CG); 2% dimethylformamide (DF2) in the second; 4% dimethylformamide (DF4) in the third; and 6% dimethylformamide (DF6) in the fourth. All of the dilutions were made at 27°C. The samples were frozen and stored in liquid nitrogen. After one week, the semen samples were thawed at 37° C for 1 minute, and their morphology and acrosomal integrity were tested, and the samples were then submitted to hypoosmotic swelling test and computer-aided semen analysis (CASA). The data were submitted to an ANOVA followed by a Student's *t*-test ($P<0.05$). A significant difference in total motility was observed during the computer analysis; the mean for the control group (52.3 ± 4.5) was higher than that of the other groups (20.5 ± 4.5 , DF2; 24.9 ± 4.5 , DF4; and 25.5 ± 4.5 , DF6; $P<0.05$). The populations of static, slow and rapid moving spermatozoa were significantly greater in CG in comparison to the other groups (G2, G4, and G6). These results indicate that, in the concentrations tested in this study, dimethylformamide, along with ACP-106C and 10% egg yolk as a diluent, produces unsatisfactory *in vitro* results for freezing dog semen, and it is not recommended for use as a cryoprotectant.

Keywords: dimethylformamide; powdered coconut water; dog; freezing; semen; cryoprotectant.

INTRODUCTION

Many studies are currently being conducted to determine the best conditions for freezing dog sperm (Ström *et al.*, 1997; Verstegen *et al.* 2002; Rijsselaere *et al.*, 2005). Freezing allows genetic material to be stored for an undetermined period of time. However, to store this genetic material, it is necessary to use a substance to protect the sperm from injuries caused by freezing and thawing processes; these substances are called cryoprotectants.

Cryoprotectants are essential for freezing in most biological systems, but some cells cannot survive the freezing process even when these substances are used; cryoprotectants can have toxic effects that are dependent on their concentration (Oliveira *et al.*, 2006).

The cryoprotectant most commonly used to freeze dog semen is glycerol (Silva *et al.*, 2003), and the best results are achieved when it is used in concentrations between 2 and 8% (Olar *et al.*, 1989; Peña *et al.* 1998; Rota *et al.*, 1998). However, glycerol can have a deleterious effect on sperm fertility. The toxic effects of glycerol on spermatozoa have been described by many authors (Fahy, 1986; England, 1993; Medeiros *et al.*, 2002). Because of these toxic effects, and in order to achieve better results with frozen semen, many alternative cryoprotectant substances, such as amides, are being tested (Futino *et al.*, 2008).

Amides belong to the group of penetrating cryoprotectants that act by means of their colligative properties, decreasing the intracellular freezing point. Thus, a greater amount of water will remain in a liquid state in low temperatures, decreasing the

intracellular concentration of solutes and creating a less harmful environment for the spermatozoa during freezing (Holt, 2000).

Because of these properties, amides have been used as alternative cryoprotectants for semen in several species, including dogs (Zimmermam *et al.*, 2007; Futino *et al.*, 2008), rabbits (Hanada & Nagase, 1980; Kashiwazaki *et al.*, 2006), chickens (Chalah *et al.* 1999; Tselutin *et al.*, 1999; Lukaszewick 2002), fish (Johnson & Larsson, 1985), horses (Alvarenga *et al.*, 2005), and pigs (Bianchi *et al.*, 2008).

Thus, the objective of this study was to evaluate the use of different concentrations of dimethylformamide diluted in powdered coconut water, ACP trade mark-106 C, as an alternative cryoprotectant for freezing dog semen.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

We used five adult Boxer dogs between the ages of 18 months and 9 years with weights between 30 and 35 kg. All dogs belonged to private breeders. The dogs were submitted to a weekly breeding soundness examination. They were fed a commercial pelletized feed and had access to water *ad libitum*.

Semen collection and evaluation

We used two ejaculates from each dog, for a total of ten. Ejaculates were collected using manual stimulation (Christiansen, 1988) in the morning between 9 and 11am. The semen was collected into graded glass tubes attached to a funnel. The

fractions of semen were separated by changes in color. Only the second fraction, which was rich in spermatozoa, was used in the analysis. At least 90% of the sperm in the samples were mobile, and 85% had a normal morphology.

After collection, the fresh semen was evaluated macroscopically for color and volume and microscopically for concentration, percentage of spermatozoa with linear and progressive motility, vigor, morphology, acrosomal integrity and hypoosmotic swelling.

The sperm concentration was determined using a Neubauer chamber and a 10 μ L aliquot of semen diluted in 2 mL of saline solution with 1% formalin (Cardoso *et al.*, 2003).

The percentage of spermatozoa with linear and progressive motility, as well as the vigor of the spermatozoa (measured on a scale from 0 to 5), was evaluated subjectively using a drop from the sample on a slide and cover glass.

The morphology and acrosomal integrity of spermatozoa were assessed using a 200 cell count in a wet smear with Rose Bengal stain. The cells were classified morphologically as being normal or having primary or secondary alterations and were separated according to the location of the alteration (head, intermediate piece and tail). Acrosomal integrity was classified as being undamaged or damaged (Silva *et al.*, 2006) and was evaluated using an optical microscope and a 1000x magnification.

A hypoosmotic swelling test was performed to assess the plasmatic membrane of the spermatozoa. A 10 μ L aliquot of semen was incubated at 38°C in 90 μ L of a hypoosmotic solution (0 mOsm/L) consisting of distilled water. After this 45 minute incubation, the semen aliquot was analyzed under the optical microscope (400x), and

200 cells were counted. The sperm with swollen coiled tails were considered to have a functional plasmatic membrane. The percentage of spermatozoa with a functional membrane (those that had a positive osmotic response) was determined (Quintela *et al.*, 2004).

Diluent medium

A powdered coconut water-based diluent (ACP-106C, ACP BIOTECNOLOGIA[®], Fortaleza-Ceará, Brazil) was used to freeze the semen. The diluent was reconstituted in autoclaved distilled water and prepared following the manufacturer's recommendations with a pH of 7.07 and an osmolarity of 440mOsm. Egg yolk was added to the diluent at concentrations of 10% of the final volume. The diluent, already containing the egg yolk, was then divided into four aliquots. Different concentrations of cryoprotectant were added to the aliquots as follows: 6% glycerol (control group - CG), 2% dimethylformamide (DF2), 4% dimethylformamide (DF4), and 6% dimethylformamide (DF6).

Semen processing

After being diluted at 27 °C, the semen samples from all groups were put into glass tubes, which were placed in water in a receptacle and stored in a cold box with recyclable ice (15 °C) for 40 minutes. After this period, the tubes containing the semen were transferred to a refrigerator for 30 minutes at 4°C. The semen was placed in 0.25mL straws with a final concentration of 100×10^6 and analyzed again. The straws were set horizontally on a freezing frame 5 cm above the level of liquid nitrogen for 5 minutes and were finally plunged into the liquid nitrogen tank (-196 °C). After one

week, the samples were thawed in a water bath at 37 °C for 1 minute (Silva *et al.*, 2006) and evaluated using the same method described for fresh semen before being submitted to a computer analysis.

Computer-Aided Semen Analysis (CASA)

A computer analysis of sperm motility was performed using a phase contrast microscope connected to a video camera adapted to the *Sperm Class Analyser*® system (SCA, Microptic S.L., version 3.2.0).

The computer-aided semen analysis (CASA) was conducted according to Iguerouada & Verstegen (2001). After thawing, the semen samples (10 µL) were placed in a Makler chamber that had been maintained at 37°C for 1 min. The chamber was then analyzed with CASA, where three different microscopic nonconsecutive fields were selected randomly by scavenging.

The settings of the instrument were as follows: frame rate, 25 frames/sec; minimum contrast, 75; straightness threshold, 75%; low velocity average pathway (VAP) cutoff, 10; and medium VAP cutoff, 55. Three nonconsecutive, randomly selected microscopic fields were scanned. The following parameters were analyzed: number of cells counted, total motility (%), progressive motility (%), velocity average pathway (VAP; mm/sec), straight line velocity (VSL; mm/sec), curvilinear velocity (VCL; mm/sec), amplitude of lateral head (ALH; µm), beat cross frequency (BCF; Hz), straightness (STR; %), and linearity (LIN; %), as well as spermatozoa subpopulations.

Statistical analysis

The data on fresh semen, as well as the total sperm motility and sperm vigor as determined by subjective analysis, were expressed as means $\pm$ standard deviation. The other data were initially submitted to Kolmogorov-Smirnov and Bartlett tests to verify the normality and homogeneity of variances, respectively. When the requirements for using an analysis of variance (ANOVA) were confirmed, ANOVAs were performed using the GLM procedure of the SAS program (1999). The linearity, straightness, acrosomal integrity, and morphology variables had a low coefficient of variation, and their averages were compared using a Student-Newman-Keuls (SNK) test. In order to avoid a type II error due to the high coefficient of variation, a Student's *t*-test was used to compare the averages in the remaining variables assessed (Steel *et al.*, 1997). Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation of the mean, and a 5% level of significance was used.

RESULTS

The spermatozoa-rich fraction of the dog ejaculates had an opalescent-white color and a milky viscosity. The characteristics of the fresh semen are described in Table 1.

No significant differences were observed in the diluted and chilled semen in any of the four groups in terms of the total motility (Table 2) and vigor (Table 3). However, after thawing, the total motility in the control group (CG) was higher ($P < 0.05$) than in groups DF2, DF4, and DF6. However, there was no significant difference in the progressive motility of any of the groups tested (Table 4).

There were no statistical differences in the tested groups after thawing (Graph 1) for the percentage of morphologically normal sperm, or for the acrosomal integrity and membrane function of the sperm.

The results from the computer analysis indicated that the percentage of rapidly moving spermatozoa was higher in the control group than in the other groups ($P < 0.05$), and the percentage of static spermatozoa was lower than in the other groups ($P < 0.05$). The population of average spermatozoa was not different in any of the four groups ($P > 0.05$), and the population of slow moving spermatozoa was significantly higher in CG when compared to DF6 ($P < 0.05$). The populations of slow spermatozoa in groups DF2 and DF4 were not different from that of the other groups ($P > 0.05$; Table 5).

Table 6 shows the results for the sperm motility patterns, as assessed by the computer analysis. There was no significant difference between the control group and the experimental groups ($P > 0.05$).

DISCUSSION

The characteristics of the fresh semen indicated that the semen was within the normal range of these parameters for canine species (Johnston *et al.*, 2001) and was of excellent quality. This is likely because we used well-bred dogs that were exhibited in dog shows and fed good quality food supplemented with essential trace minerals. Another factor that may have contributed to the high quality of the semen was the environmental temperature during collection, which was approximately 27°C. According to Sorribas (1995), the volume of semen can vary with the breed, age, and

size of the animals and can also be influenced by the climate and frequency of collection.

No significant differences were found in terms of total motility and vigor in the diluted and chilled semen from groups containing different concentrations of dimethylformamide. However, a reduction in these parameters due to damage may occur during chilling as this causes a decrease in spermatozoa metabolism (Futino *et al.*, 2008).

After thawing, both treatments were found to be below the acceptable range of progressive motility for artificial insemination. According to Concannon and Battista (1989), a post-thawing motility above 30% is considered to be acceptable for artificial insemination. On the other hand, with these the results, the semen could be used for *in vitro* fertilization since for dogs, a ratio of only two million motile spermatozoa for 30 homologue oocytes is used for *in vitro* fertilization (Silva *et al.*, 2006).

In this study, we observed that the total motility post-thawing was better for glycerol than for dimethylformamide. Lopes *et al.* (2009) had results for total motility after thawing of approximately 43.1% for glycerol and 21.5% for dimethylformamide. The low percentage of motile spermatozoa after thawing could be a result of the negative effect of the interaction between the diluent ACP-106C and the cryoprotectant dimethylformamide because we observed clots after dilution that were later confirmed in the computer analysis of the semen as being particles that were larger than sperm.

Although both of the cryoprotectants used in this study can protect spermatozoa during freezing, they use different mechanisms of protection (Bianchi *et al.*, 2008). Glycerol is an alcohol that has three functional hydroxyl groups that can sometimes

bind to each other, reducing the probability that these groups will bind to a molecule of water. This effect of binding to water is undesirable in the processes of freezing and thawing as it increases the formation of intracellular ice crystals (Karow, 2001).

Amides have a lower molecular weight (73.09) in relation to glycerol (92.05) and thus can reduce osmotic stress when compared to glycerol (Dalimata and Graham, 1997; Ball & Vo, 2001). Furthermore, amides have a low viscosity and a high solubility in water (Hanada and Nagase, 1980; Oliveira *et al.*, 2006; Alvarenga *et al.*, 2005) and are formed by functional groups that contain nitrogen, which favors interactions with water. Amides are also hydrophilic in nature, which allows for a greater interaction with water and reduces the formation of ice crystals inside the cell (Bianchi *et al.*, 2008). However, even when using different concentrations of dimethylformamide, we noted that there was no influence of dimethylformamide in relation to glycerol; that is, it could penetrate the spermatozoa membrane more easily, thus reducing its toxic effects (Squires *et al.*, 2004).

The results of the sperm morphology, acrosomal integrity, and hypoosmotic swelling tests are in accordance with the results found by Silva *et al.* (2005). The thawing process used in the study allowed an adequate preservation of sperm morphology. In terms of membrane function, the literature indicates that morphology is preserved in 34 to 58.8% of sperm (Oliveira *et al.* 2006; Futino *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2009), which are lower than the values found in this study (70%). These values were higher than the post-thawing motility results. Most spermatozoa in diluent ACP-106C may have been able to retain a functional membrane after the freezing-thawing process.

It is important to stress that this study was the first to test different concentrations of dimethylformamide in dog semen using ACP-106C as a diluent

medium. In previous studies using dog semen, concentrations ranging from 3 to 14% dimethylformamide were used with Tris-yolk, Tris-citrate or lactose diluents (Oliveira *et al.*, 2006; Futino *et al.*, 2008; Zimmermann *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2009).

Sperm subpopulations showed a large percentage of static spermatozoa, which corresponds with the low sperm motility observed in the groups containing dimethylformamide; the interaction between the cryoprotectant and the diluent ACP-106C may also have influenced these results. This interaction may not have been observed due to the difficulty of visualizing and classifying the sperm during the computer analysis of semen. Additionally, the results of the motility patterns verified by CASA were similar to those described by Lopes *et al.* (2009) and were lower than those described by Cardoso *et al.* (2007). The latter used diluent ACP-106C, similar to that used in this study. According to Schäfer-Somi *et al.* (2006), semen diluents can influence the linearity of sperm, while straightness is associated with fertility (Holt *et al.*, 1997; Slott *et al.*, 1997). However, the threshold at which this parameter could influence fertility of dog sperm is still unknown.

CONCLUSION

When used in the concentrations tested in this study, dimethylformamide added to the diluent ACP-106C and 10% egg yolk provides *in vitro* results that are considered unsatisfactory for freezing dog semen, and the use of this cryoprotectant is not recommended.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge Canil Grande Canafístula from Fortaleza.

REFERENCES

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

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, v.22, p.1061-1069, 2001.

BIANCHI, I., CALDERAM, K., MASCHIO, E.F., MADEIRA, E.M., ULGUIM, R.R., CORCINI, C.D., 2008. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology* 69, 632-638.

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.

CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., SILVA, L.D.M., CHIRINÉA, V.H., SOUZA, F.F., LOPES, M.D., 2007. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 11–16.

CHALAH, T., SEIGNEURIN, F., BLESBOTS, E., 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different technique and relationship with subsequent fertility in vivo. *Criobiology* 39, 185-191.

CONCANNON, P.W., BATISTA, M., 1989. Canine semen freezing and artificial insemination, in: KIRK, R.W. (Ed.), Current Veterinary Therapy – Small Animal Practice. Saunders, Philadelphia, pp. 1247-1259.

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

DALIMATA, A.M., GRAHAM, J.K., 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. Theriogenology 49, 831-841.

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

FAHY, G.M., 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. Cryobiology 23, 1-13.

FUTINO, D.O., MENDES, M.C., MATOS, W.N., MONDADORI, R.G., LUCCI, C.M., 2008. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. Reprod. Dom. Anim., doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01208.x.

HANADA, A., NAGASE, H., 1980. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 60, 247-252.

HOLT, W.V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. An. Reprod. Sc. 62, 3-22.

HOLT, C., HOLT, W.V., MOORE, H.D., REED, H.C., CURNOCK, R.M., 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results o two fertility trials. J. Androl. 18, 312-323.

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J.P., 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55, 671-84.

JOHNSON, L.A., LARSSON, K., 1985. Deep freezing of boar semen. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.

JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OLSON, P.N.S., 2001. Canine and Feline *Theriogenology*. W.B. Saunders, Philadelphia.

KAROW, A.M., 2001. For mammalian embryologists. *Cryobiology*. Georgia, USA: Augusta.

KASHIWAZAKI, N., OKUDA, Y., SEITA, Y., 2006. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as crioprotectants of japanese white rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Develop.*, 52, 4, 511-516.

LOPES, K.R.F.; COSTA, L.L.M., LIMA, G.L., SOUZA, A.L.P., SILVA, A.R., 2009. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine. *Theriogenology*, 72, 650-654.

LUKASZEWICZ, E., 2002. An effective method for freezing White Italian Garder semen. *Theriogenology*, 58, 19-27.

MEDEIROS, A.S.L., GOMES, G.M., CARMO, M.T., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A., 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 58, 273-276.

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.

OLIVEIRA, E.C.S, JULIANI, G.C, MARQUES, A.P.J.R., HENRY, M. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. 2006, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58, 6, 1116-1122.

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

QUINTELA, A.T., GUSMÃO, A.L., LOPES, M.D., SILVA., 2004. Hyposmotic test with distilled water to evaluate sperm plasma membrane integrity of dog semen – preliminary data. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, BRAZIL, 15, 2004, Porto Seguro, Anais..., Porto Seguro, , p.518.

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

ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C., VANOZZI, J., ROMAGNOLI, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 1998. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. *Reprod. Dom. An.*, 38, 355-361.

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

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M., 2003. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. Ver. Port. Ci. Vet., 98, 546, 53-60.

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M., 2005. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. Reprod. Dom. An., 40, 1-5.

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M., 2006. Influence of temperature during glycerol addition and post thaw dilution on the quality of canine frozen semen. Reprod. Dom. Anim., 41, 74-78.

SLOTT, V.L., JEFFAY, S.C., DYER, C.J., BARBEE, R.R., PERREAULT, S.D., 1997. Sperm motion predicts fertility in male hamsters treated with alpha-chlorohydrin. J Androl., 18, 708-716.

SORRIBAS, C.E., 1995. Reproduccion em los pequeños animales. Ed. Intermedica, BuenosAires.

SQUIRES, E.L., KEITH, S.L., GRAHAM, J.K., 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. Theriogenology, 62, 1056-1065.

STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H., DICKY, D., 1997. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, 3rd ed. McGraw-Hill, New York.

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

TSELUTIN, K., SEIGNEURIN, F., BLESBOTIS, E., 1999. Comparison of crioprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poultry Sc., 78, 4, 586-590.

VERTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, 57, 149 179.

ZIMMERMANN, M, SANTOS T. E, FIDELIS A.A.G, BLUME H, MONDADORI R. G. 2007. Uso de dimetil-formamida e água de coco na congelação de sêmen canino. Biosci. J., 23, 1, 96-100.

Table 1: Characteristics (mean $\pm$ SEM) of the sperm fraction in fresh dog semen (n=10 ejaculates).

Characteristics	Média $\pm$ SEM
Volume (mL)	0.93 $\pm$ 0.29
Concentration (number of spermatozoa $\times 10^6$ /mL)	1.581 $\pm$ 551.57
Motility (%)	100.0 $\pm$ 0.0
Vigor (0 – 5)	5.0 $\pm$ 0.0
Normal spermatozoa (%)	88.11 $\pm$ 4.72
Acrossomal integrity (%)	96.25 $\pm$ 2.62
Functional membrane (%)	96 $\pm$ 2.66

Table 2: Mean $\pm$ SEM of total motility verified by a subjective analysis of diluted and chilled dog semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide. (P>0.05).

Motilidade total (%)	CG	DF2	DF4	DF6
Diluted	96.5 ± 4.11	94.75 ± 3.94	97.5 ± 2.63	95 ± 4.08
Chilled	92.5 ± 4.85	94 ± 3.94	96 ± 3.16	92.5 ± 5.89

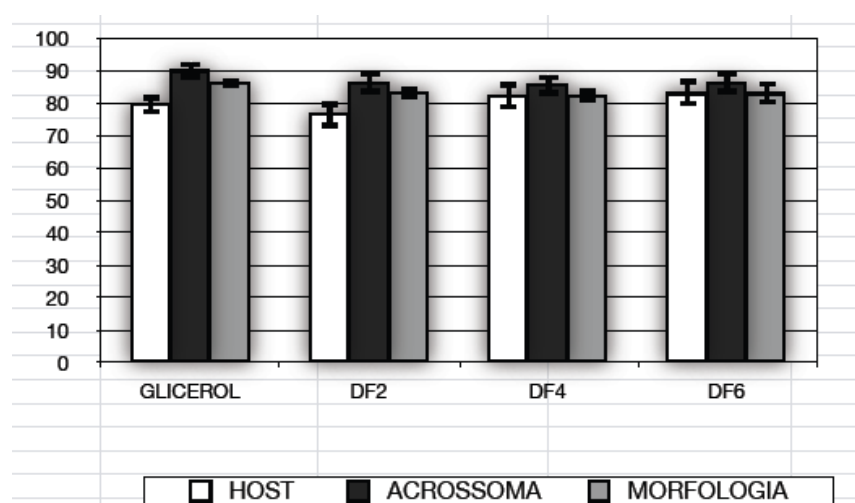
Table 3: Mean ± SEM of sperm vigor verified by subjective analysis of diluted and chilled dog semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide. (P>0.05).

Vigor (0-5)	CG	DF2	DF4	DF6
Diluted	4.8 ± 0.42	4.8 ± 0.42	4.9 ± 0.31	4.7 ± 0.48
Chilled	4.4 ± 0.51	4.6 ± 0.51	4.8 ± 0.42	4.3 ± 0.67

Table 4: Mean ± SEM of post-thawing total and progressive motility of sperm verified by computer analysis of dog semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide.

Motilidade	CG	DF2	DF4	DF6
Total motility (%)	52.3 ± 9.81 ^a	20.5 ± 4.3 ^b	24.9 ± 6.25 ^b	25.5 ± 6.63 ^b
Progressive motility (%)	7.68 ± 2.59 ^a	3.98 ± 1.15 ^a	3.26 ± 1.29 ^a	3.44 ± 1.23 ^a

^{a,b} Within a row, means without a common superscript differed (P<0.05).



Graph 1: Average sperm morphology, hypoosmotic swelling test, and acrosomal integrity verified by subjective analysis of frozen dog semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide. ($P>0.05$).

Table 5: Mean $\pm$ SEM of subpopulations of sperm verified by computer analysis of frozen dog semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide.

Subpopulations of sperm (%)	CG	G2	G4	G6
Fast spermatozoa	2.35 $\pm$ 0.74 ^a	1.29 $\pm$ 0.60 ^b	0.71 $\pm$ 0.30 ^b	0.70 $\pm$ 0.55 ^b
Average spermatozoa	7.87 $\pm$ 1.25 ^a	3.68 $\pm$ 0.93 ^a	11.06 $\pm$ 7.49 ^a	3.6 $\pm$ 1.30 ^a
Slow spermatozoa	35.3 $\pm$ 5.29 ^a	15.33 $\pm$ 3.01 ^{ab}	20.45 $\pm$ 5.03 ^{ab}	21.08 $\pm$ 4.98 ^b
Static spermatozoa	47.6 $\pm$ 9.82 ^b	79.7 $\pm$ 4.28 ^a	72.6 $\pm$ 5.9 ^a	74.6 $\pm$ 6.65 ^a

^{a,b} Within a row, means without a common superscript differed ($P<0.05$).

Table 6: Mean $\pm$ SEM motility end points, measured by CASA of frozen/ thawed canine semen submitted to different concentrations of dimethylformamide. CG: control group, DF2: 2% dimethylformamide, DF4: 4% dimethylformamide, and DF6: 6% dimethylformamide. ($P>0.05$).

Parameters	CG	G2	G4	G6
VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	31.3 ± 5.97	32.5 ± 4.28	33.8 ± 5.60	36.8 ± 3.77
VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	16.3 ± 3.02	17.2 ± 3.58	16.9 ± 2.8	17.3 ± 1.64
VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	21.4 ± 4.06	21.8 ± 4.10	22.7 ± 3.66	24.1 ± 2.27
LIN (%)	53.0 ± 2.29	51.7 ± 1.63	50.6 ± 1.78	47.7 ± 1.42
STR (%)	77.0 ± 1.53	77.4 ± 1.91	74.3 ± 1.69	71.8 ± 1.0
ALH (μm)	2.1 ± 0.35	2.0 ± 0.5	2.7 ± 0.54	2.9 ± 0.54
BCF (Hz)	6.3 ± 0.99	5.3 ± 1.25	7.7 ± 1.51	6.7 ± 1.27

VCL, curvilinear velocity; VSL, velocity straight line; VAP, velocity average pathway; ALH, amplitude lateral head; BCF, beat cross frequency; STR, straightness; LIN, linearity.

7. CAPÍTULO 2

Artigo 2: Artigo a ser submetido ao periódico “*Theriogenology*”, qualificado como A2 no último QUALIS da Medicina Veterinária.

Diferentes temperaturas de adição da dimetilformamida adicionada ao diluidor ACP-106C para a congelação de sêmen canino

*(Different temperatures of addition of dimethylformamide added to ACP-106C extender
for freezing canine semen)*

Antonio Cavalcante Mota Filho¹, Carlos Henrique de Andrade Teles¹, Ricardo Parente
Jucá¹, Daniel Couto Uchoa¹, Cláudio Cabral Campello², Alexandre Rodrigues Silva³,
Lúcia Daniel Machado da Silva^{1*}

¹Laboratory of Carnivore Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, State University of
Ceara.

²LAMOFOPA, Faculty of Veterinary, State University of Ceará

³ Laboratory of Animal Germoplasm Conservation, Federal Rural University of Semi-Aride,
Rio Grande do Norte
1700, Paranjana Avenue

Campus do Itaperi, CEP 60740-903, Fortaleza, CE, Brazil

* Corresponding author: lucia.daniel.machado@hotmail.com

Phone number: 00 55 ** 85 3101-9854

Fax number: 00 55 ** 85 3101-9840

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi comparar o efeito da temperatura de adição da dimetilformamida (27 e 4°C) sobre o sêmen canino diluído em ACP-106 C e congelado. Dez ejaculados provenientes de cinco cães foram coletados por manipulação digital. A fração espermática foi avaliada e dividida em três alíquotas. A primeira alíquota foi diluída em ACP-106 C com 10% de gema de ovo e glicerol a 27°C (G27), a segunda diluída em ACP-106 C com 10% de gema de ovo e dimetilformamida a 27°C (DF27) e a terceira diluída em ACP-106 C com 10% de gema de ovo e dimetilformamida a 4°C (DF4). As amostras foram congeladas e estocadas em nitrogênio líquido. Aproximadamente após uma semana, as amostras foram descongeladas e submetidas às avaliações de morfologia, integridade acrossomal, teste hiposmótico e percentual de vivos, bem como análise computadorizada. Nenhuma diferença foi observada entre as temperaturas de adição da dimetilformamida com relação aos parâmetros seminais avaliados. Na análise computadorizada, foi evidenciada uma superioridade do grupo controle (G27) para os parâmetros motilidade progressiva ($16,49 \pm 12,22$ %), VAP ($39,81 \pm 13,76$ $\mu\text{m}/\text{sec}$), VCL ($49,61 \pm 21,47$ $\mu\text{m}/\text{séc}$), VSL ($32,52 \pm 13,10$ $\mu\text{m}/\text{séc}$), LIN ($59,87 \pm 11,13$ %), STR ($79,85 \pm 8,36$ %) e ALH ($2,92 \pm 0,44$ μm), em relação aos grupos contendo dimetilformamida. Também foi verificado um elevado número de espermatozoides com movimento rápido no grupo controle pós-descongelção. Conclui-se que não há influência da temperatura de adição da dimetilformamida com a utilização do diluidor ACP-106 C, na qualidade do sêmen canino.

Palavras-chaves: dimetilformamida, água de coco em pó, cão, congelação, sêmen, temperatura de adição.

ABSTRACT

The objective of the present work was to compare the effect of the temperature of addition of the dimethylformamide (27 and 4°C) on the canine semen diluted in ACP-106 C and frozen. Ten ejaculated coming of five dogs they were collected by digital manipulation. The fraction of sperm was evaluated and divided in three aliquots. The first aliquot was diluted in ACP-106 C with 10% of egg yolk and glicerol to 27°C (G27), the second diluted in ACP-106 C with 10% of egg yolk and dimethylformamide to 27°C (DF27) and the third diluted in ACP-106 C with 10% of egg yolk and dimethylformamide to 4°C (DF4). The samples were frozen and stored in liquid nitrogen. Approximately after one week, the samples were thawed and submitted to the morphology evaluations, integrity acrossomal, hypoosmotic swelling test and percentile of live, as well as computerized analysis. No difference was observed among the temperatures of addition of the dimethylformamide with relationship to the appraised seminal parameters evaluated. In the computerized analysis, a superiority of the group was evidenced it controls (G27) for the parameters progressive mobility ($16,49 \pm 12,22$ %), VAP ($39,81 \pm 13,76 \mu\text{m} / \text{sec}$), VCL ($49,61 \pm 21,47 \mu\text{m} / \text{séc}$), VSL ($32,52 \pm 13,10 \mu\text{m} / \text{séc}$), LIN ($59,87 \pm 11,13$ %), STR ($79,85 \pm 8,36$ %) and ALH ($2,92 \pm 0,44 \mu\text{m}$), in relation to the groups containing dimethylformamide. A high number of sperm with rapid movement in the control group post-thaw. It was concluded that there is no influence of the temperature of addition of dimethylformamide with the use of ACP-106 C extender on the quality of canine semen.

Key Words: dimethylformamide; powdered coconut water; dog; freezing; semen; cryoprotectant.

INTRODUÇÃO

Os crioprotetores são de fundamental importância para o meio diluidor, na congelação do sêmen, entretanto, não permitem a sobrevivência total das células, o que pode ser explicado por apresentarem efeitos tóxicos que dependem principalmente da concentração do crioprotetor utilizado e do período de exposição ao mesmo (Oliveira *et al.*, 2006).

O crioprotetor mais utilizado na congelação de sêmen de cão é o glicerol (Silva *et al.*, 2006). No entanto, observa-se uma evolução na utilização de crioprotetores alternativos como o etileno glicol que é um álcool (MARTINS BESSA *et al.*, 2006) e a dimetilformamida que é uma amida (FUTINO *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2009).

As amidas são crioprotetores penetrantes derivados dos ácidos carboxílicos e aminas, que apresentam três sítios de ligação de hidrogênio com a molécula de água, a metade em comparação ao glicerol (BIANCHI *et al.*, 2008). No entanto, por possuírem menor viscosidade, baixo peso molecular e solubilidade à água, penetram melhor através da membrana plasmática celular e também são menos tóxicas do que o glicerol (NASH, 1966), diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causados pelos crioprotetores (BALL & VO, 2001).

Utilizando diferentes meios diluidores e diferentes concentrações de dimetilformamida para o sêmen canino, (OLIVEIRA, 2003; ACIPRESTE, 2006; ZIMMERMANN *et al.*, 2007; FUTINO *et al.*, 2008), testaram a utilização da mesma em temperatura ambiente, diferentemente de LOPES *et al.* (2009) que fizeram a adição de dimetilformamida a 4°C. Para o sêmen canino, alguns autores realizam a adição do crioprotetor em temperaturas como a 32°C (YILDTZ *et al.*, 2000), 35°C (NÖTHLING & SHUTTLEWORTH, 2005), temperatura ambiente (ROTA *et al.*, 1996) e ainda a 4°C (CARDOSO *et al.*, 2005).

As amidas vêm sendo estudada em várias espécies como equinos (ALVARENGA *et al.*, 2005), suínos (BIANCHI *et al.*, 2008) e cães (FUTINO *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2009), no entanto a temperatura de adição da dimetilformamida ainda não foi testada.

Visto o grande número de trabalhos utilizando a dimetilformamida, sem interferência na qualidade espermática e, a carência de estudos sobre a temperatura de adição da mesma ao diluidor ACP-106C para a congelação de sêmen canino, o trabalho teve como objetivo comparar o efeito da adição da dimetilformamida a 27 e 4°C sobre a qualidade do sêmen canino diluído em ACP-106C e congelado.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram selecionados cinco cães, oriundos de canis particulares, sendo dois da raça Boxer, dois Rodhesians Ridgeback e um Beagle, com idade entre 11 meses e cinco anos. Foi utilizado um total de 10 ejaculados, sendo dois de cada cão. Os animais foram mantidos em canis individuais com livre acesso à água e alimentados uma vez ao dia com ração comercial.

Coleta e avaliação de sêmen

A coleta de sêmen foi realizada através da técnica de manipulação digital (CHRISTIANSEN, 1988). A fração rica em espermatozóides foi destinada a avaliações e posterior congelação. No sêmen a fresco, foram observados os parâmetros macroscópicos de cor e volume. Os parâmetros microscópicos de motilidade (percentual de espermatozóides com motilidade progressiva e retilínea) e vigor espermático, mensurado em uma escala de 0 (ausência de movimento) a 5 (movimento vigoroso, retilíneo e progressivo; CBRA, 1998) foram avaliados com auxílio de microscópio óptico (100x).

A morfologia espermática e a integridade acrossomal foram avaliadas através da contagem de 200 células em esfregaço úmido corado com rosa de bengala, sendo as células classificadas como normal ou anormal para a morfologia e o acrossoma classificado como intacto ou danificado. Também se avaliou o percentual de

espermatozóides vivos através do corante azul de bromofenol, em que foram contadas 100 células com auxílio de microscópio de luz com aumento de 400x, sendo classificados como vivos os espermatozóides que não estavam corados (DERIVAUX, 1980). Estas avaliações foram realizadas em microscopia de luz, em aumento de 1000x.

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

Para verificar a funcionalidade de membrana, foi realizado o teste hiposmótico (HOST) em que 0,01 mL de sêmen foi diluído em 0,09 mL de água destilada (solução hiposmótica) e mantido em banho-maria a 38°C por 45 minutos. Após este período, uma alíquota espermática foi colocada em uma lâmina de vidro, coberta com lamínula, sendo contadas 200 células com auxílio de microscópio ótico com aumento de 400x. A membrana espermática foi considerada funcional quando os espermatozóides apresentavam sua cauda enrolada (SPITTALER & TYLER, 1985).

Somente amostras apresentando motilidade $\geq 85\%$, vigor ≥ 4 e alterações morfológicas totais espermáticas $\leq 15\%$, foram utilizadas para o experimento.

Processamento do sêmen

A água de coco na forma de pó (ACP-106 C, ACP BIOTECNOLOGIA[®], Fortaleza-Ceará, Brasil), foi reconstituída em água destilada autoclavada que foi preparada segundo recomendações do fabricante, apresentando um pH de 7,07 e osmolaridade de 440mOsm ao final da reconstituição. Ao diluidor foi acrescido gema de ovo, a fim de atingir-se uma concentração final de 10% de gema. Após a avaliação inicial do sêmen, este foi dividido em três alíquotas, e destinado a três grupos experimentais: grupo glicerol controle 27 (G27), grupo dimetilformamida 27 (DF27) e grupo dimetilformamida 4 (DF4).

No G27, a alíquota de sêmen foi diluída com ACP-106 C, gema de ovo e glicerol, de forma única à temperatura de 27°C. No DF27, a alíquota foi diluída com ACP-106 C, gema de ovo e dimetilformamida de forma única à temperatura de 27°C. Para o DF4, o diluidor já com a gema de ovo foi dividido em duas partes (A e B). A

parte “A” composta por ACP-106 + gema de ovo e a Parte “B”, similar à anterior, entretanto acrescida de dimetilformamida em uma concentração final de 12% foi então diluído com ½ parte do diluidor A, necessário para atingir uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL, designado como (DF4). Após esta primeira diluição, ambos os grupos armazenados em tubos de vidro foram colocados em um recipiente com água e acondicionados em caixa térmica com gelo reciclável (15°C) por 40 minutos. Em seguida, os grupos foram transferidos para um refrigerador até atingir 4°C (30 minutos).

A segunda diluição foi realizada somente no DF4, diluindo-o de forma única com a outra ½ parte do diluidor B, sendo a dimetilformamida adicionada a esta amostra à temperatura de 4°C. Após 15 minutos desta segunda diluição, o sêmen foi avaliado e envasado em palhetas de 0,25 mL, sendo dispostas horizontalmente em rampa de congelação a uma altura de 5 cm do nível de nitrogênio líquido por cinco minutos e, finalmente, armazenadas em nitrogênio líquido.

Após cerca de uma semana, as amostras foram descongeladas em banho-maria a uma temperatura de 37 °C por 1 minuto (SILVA *et al.*, 2006) e avaliadas conforme descrito para o sêmen fresco, bem como por meio da análise computadorizada.

Avaliação computadorizada do sêmen (CASA)

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

A avaliação computadorizada do sêmen (CASA) canino foi conduzida de acordo com IGUER-OUADA & VERSTEGEN (2001). Após a descongelação, as amostras de sêmen (10 µL) eram colocadas em uma câmara de Makler, a qual foi mantida por 1 min a 37°C. Em seguida, a câmara foi analisada por meio da CASA, onde três diferentes campos microscópicos, não consecutivos, foram selecionados aleatoriamente por varredura. As configurações do CASA foram: número de imagens adquiridas, 25 por segundo, contraste mínimo da célula 75; índice de progressão, 75%; velocidade mínima (VAP), 10, e velocidade média (VAP), 55. Os dados foram computadorizados e

determinados por média e erro médio padrão. Os parâmetros mensurados para cada amostra foram: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade progressiva (VSL), amplitude lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN), e determinação de subpopulações espermáticas (IGUER OUADA & VERSTEGEN, 2001).

Microscopia de fluorescência

Para a microscopia de fluorescência, foram associados os marcadores Iodeto de Propídeo (PI), Pisum Sativum (FITC-PSA) e Rodamina 123, protocolo adaptado de CELEGHINI (2005). Foi descongelada uma palheta para cada grupo experimental a 38° C/min. 150 µL de sêmen foram adicionados a 750 µL de tampão fosfato salina (PBS) (25 X 10⁶ spz/mL) em um microtubo. Em seguida, adicionaram-se 6 µL de PI, 2 µL de R123 e 50 µL FITC-PSA. Posteriormente, foram homogeneizados e incubados por 30 minutos a 37° C. Após a incubação, o microtubo foi centrifugado 800g x 10 minutos, logo após foi retirado o sobrenadante e o sedimento resuspendido em PBS. Finalmente foi confeccionada uma lâmina, sendo então contadas 200 células no microscópio de fluorescência.

Os espermatozoides receberam a seguinte classificação: Lesão na membrana plasmática, acrossoma danificado e com atividade mitocondrial (PI⁺, FITC-PSA⁺, R⁺), lesão na membrana plasmática, acrossoma íntegro e com atividade mitocondrial (PI⁺, FITC-PSA⁻, R⁺), membrana plasmática sem lesão, acrossoma íntegro e com atividade mitocondrial (PI⁻, FITC-PSA⁻, R⁺).

Os espermatozoides receberam a seguinte classificação: (PI⁺): Lesão na membrana plasmática marcado com a cor vermelha, (PI⁻): Sem lesão na membrana plasmática sem marcação/incolor, (FITC-PSA⁺): Acrossoma danificado marcado com a cor verde, (FITC-PSA⁻): Acrossoma íntegro sem marcação/incolor, (R⁺): Peça intermediária com atividade mitocondrial marcado com a cor verde, (R⁻): Peça intermediária sem atividade mitocondrial sem marcação/incolor.

Análise estatística

Os dados do sêmen a fresco, bem como da motilidade total e do vigor espermático verificados por análise subjetiva e dos parâmetros avaliados pelo CASA foram expressos sob a forma de média $\pm$ erro padrão. Diferentes procedimentos estatísticos foram empregados nas análises: nas variáveis em que houve homogeneidade de variâncias, foi feita ANOVA, seguida do teste t de Student (para $CV > 15\%$) ou do teste de Student-Newman-Keuls (SNK, para $CV < 15\%$). Nos casos em que não ocorreu homocedasticidade, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

A fração espermática do sêmen a fresco apresentou características dentro dos padrões normais para a espécie canina (CBRA, 1998), com uma coloração branca opalescente. As características do sêmen a fresco estão descritas na tabela 1.

Após a descongelação, não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) da motilidade total entre os 3 grupos: $53,52 \pm 26,44\%$ (G27), $35,23 \pm 27,19\%$ (DF27) e $43,19 \pm 28,57\%$ (DF4). Já com relação à motilidade progressiva, o G27 ($16,49 \pm 12,22\%$) foi superior aos grupos DF27 ($3,27 \pm 2,24\%$) e DF 4 ($4,63 \pm 3,30\%$).

Com relação aos padrões de morfologia espermática, integridade de acrossoma, funcionalidade de membrana e percentual de espermatozóides vivos pós-descongelação, não houve diferença estatística em relação aos grupos testados (Figura 1).

Na avaliação computadorizada do sêmen imediatamente após a descongelação, foi observada que a VCL do G27 foi significativamente superior a do DF27 ($p < 0,05$), enquanto que a do DF4 não diferiu de ambos os grupos. Com relação à VSL, VAP, LIN, STR e ALH, o G27 sempre mostrou-se melhor do que os demais grupos ($p > 0,05$), enquanto que DF27 e DF4 não diferiram entre si ($p > 0,05$). Não houve diferença entre os três grupos com relação ao BCF ($p > 0,05$) (tabela 2).

Com relação às subpopulações espermáticas, observou-se uma superioridade do G27 entre o percentual de espermatozóides com movimento rápido em relação aos

demais grupos ($P < 0,05$). Já com relação à população de espermatozoides com movimento médio, o DF27 foi inferior ao G27 ($p < 0,05$), ao passo que o DF4 não diferiu de nenhum dos outros dois ($p > 0,05$). O percentual de espermatozoides lentos e estáticos não diferiu entre os três grupos ($p > 0,05$) (tabela 3).

Os resultados de microscopia de fluorescência estão descritos na tabela 4, em que se observam as populações de células marcadas com o PI, FITC-PSA e R123. Pode-se verificar que não houve diferença significativa das três populações de espermatozoides entre os três grupos ($P > 0,05$). Já com relação à população de espermatozoides dentro de cada grupo, verifica-se que nos grupos G27 e DF27 a população ($PI^+ FITC-PSA^+ R^+$) foi significativamente superior às populações ($P < 0,05$) ($PI^+ FITC-PSA^- R^+$) e ($PI^- FITC-PSA^- R^+$), sendo que estas duas não diferiram entre si em ambos os grupos ($P > 0,05$). No grupo DF4, a população ($PI^+ FITC-PSA^+ R^+$) foi significativamente superior à população ($PI^- FITC-PSA^- R^+$) ($P < 0,05$), no entanto não houve diferença significativa entre as populações ($PI^{++} FITC-PSA^+ R^+$) e ($PI^+ FITC-PSA^- R^+$) e entre as populações ($PI^+ FITC-PSA^- R^+$) e ($PI^- FITC-PSA^- R^+$) ($P > 0,05$).

Com relação aos resultados das populações de células espermáticas dentro cada grupo observa-se que não houve diferença significativa em nenhum dos grupos avaliados ($P > 0,05$). No presente trabalho percebeu-se que todas as células espermáticas apresentaram atividade mitocondrial, sendo marcadas com a R123, não sendo encontradas populações de células sem atividade mitocondrial.

DISCUSSÃO

Após a descongelação, não foi evidenciada diferença estatística para o parâmetro de motilidade total nos grupos testados. No entanto, na motilidade progressiva pós-descongelação o G27 apresentou melhor resultados em relação aos dois grupos com dimetilformamida. A interação entre o crioprotetor dimetilformamida, adicionado ao diluidor ACP-106C pode ter influenciado esses resultados haja vista uma dificuldade na visualização e classificação no momento da análise computadorizada do sêmen. A motilidade progressiva da dimetilformamida, no presente trabalho foi inferior às

encontrados por Oliveira *et al.*, (2006), Zimmermann *et al.* (2007), Futino *et al.* (2008). Vale ressaltar que todos esses trabalhos avaliaram a motilidade progressiva de forma subjetiva, o que poderia causar um erro na superestimação dos resultados de motilidade progressiva.

A forma de adição de dimetilformamida não influenciou a motilidade progressiva, sendo essa inferior em relação ao glicerol. Em outras espécies como equinos (Alvarenga *et al.*, 2005), coelhos (Okuda *et al.*, 2007) e suínos (Bianchi *et al.*, 2008), a dimetilformamida tem sido utilizada como uma alternativa para animais que apresentam sêmen de baixa congelabilidade com o glicerol (LOPES *et al.*, 2009).

Os resultados de morfologia espermática e integridade de acrossoma estão de acordo com os resultados obtidos por Lopes *et al.* (2009). Esses autores não encontraram diferença na morfologia espermática, bem como na integridade acrossomal entre as temperaturas de adição da dimetilformamida em ambos os tempos de incubação.

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

No presente trabalho, pôde-se notar que a integridade de membrana não foi afetada entre os grupos testados, não diferindo entre eles após a descongelação ($P > 0,05$). Os valores obtidos neste trabalho são inferiores aos de LOPES *et al.* (2009) e ROTA *et al.* (2006). Esta redução no percentual de espermatozoides com membrana funcional provavelmente se deve às grandes alterações e danos ocorridos nas membranas espermáticas durante o processo de congelação e descongelação conforme relatados por WATSON (1995).

No presente trabalho, após a descongelação observa-se que não houve diferença entre os grupos testados, sendo observado respectivamente em G27, DF27 e DF4, $39,90 \pm 17,93\%$, $42,20 \pm 18,94\%$ e $41,30 \pm 19,80\%$ de espermatozóides vivos respectivamente ($P > 0,05$). Esses valores encontram-se próximos aos descritos por Lopes *et al.* (2009) (48,3%).

Os resultados do teste de funcionalidade de membrana foram superiores aos descritos por Futino *et al.* (2008) e inferiores aos de Lopes *et al.* (2009), ambos os autores utilizaram como diluente o Tris. Oliveira *et al.* (2006) verificaram que alguns diluentes têm menor capacidade de proteger a membrana espermática canina. Por outro lado, Santos (2006) relata que a queda na porcentagem de células espermáticas que reagem ao teste de funcionalidade de membrana após a congelação e descongelação independem do crioprotetor utilizado.

A temperatura de adição da dimetilformamida ainda não tinha sido estudada. A maioria dos trabalhos utilizam a adição desse crioprotetor à temperatura ambiente, (Acipreste, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2007; Futino *et al.*, 2008). Exceto Lopes *et al.*, (2009) que fizeram a adição da dimetilformamida a 4°C. A forma de adição gera controvérsias em outros crioprotetores, 32°C (YILDTZ *et al.*, 2000), 35°C (NÖTHLING & SHUTTLEWORTH, 2005), temperatura ambiente (ROTA *et al.*, 1996) e ainda a 4°C (CARDOSO *et al.*, 2005), mas com a dimetilformamida ainda não se podia saber qual o melhor momento para realizar a adição da mesma.

A viscosidade e a composição iônica dos meios diluentes, bem como as taxas de diluição e a temperatura podem influenciar a motilidade espermática (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001). Com isso acredita-se que a dimetilformamida por ter um menor peso molecular (73,09), em relação ao glicerol (92,05), menor viscosidade, maior capacidade para permeabilidade de membrana, reduz assim os danos causados durante o estresse osmótico (Dalimata e Graham, 1997; BALL & VO, 2001).

Foi observado que a temperatura de adição da dimetilformamida (27 ou 4°C) afetou quase todos os parâmetros avaliados pós-descongelação, sendo sempre inferior ao glicerol. Apesar destes vários trabalhos, utilizando esse crioprotetor, ainda não se sabe qual o efeito da temperatura de adição do mesmo sobre o sêmen canino, utilizando um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106 C).

Com relação aos dados da análise computadorizada, Rijsselaere et al (2003) avaliando o emprego da análise computadorizada para sêmen de cães afirmaram que sem a atenção aos ajustes técnicos, sobretudo da padronização e do processamento do sêmen, os sistemas da CASA podem fornecer dados enganadores ou errôneos. Entretanto, uma vez que o sistema é padronizado para espécie, podem oferecer uma análise rápida e objetiva de um grande número de espermatozóides, e podem gerar uma caracterização muito detalhada da dinâmica espermática. Além disso, este dispositivo melhora significativamente a exatidão e a precisão de métodos subjetivos existentes da análise do sêmen do cão e faz a comparação entre laboratórios possível.

Ainda são restritas as informações a respeito das relações existentes entre os resultados da análise computadorizada e o índice de fertilidade do sêmen analisado. Embora, um avanço substancial tenha ocorrido nas análises de sêmen de cão, surpreendentemente, poucos parâmetros foram correlacionados com a fertilidade *in vivo* (RIJSSELAERE *et al.*, 2005).

Muitos estudos demonstraram uma alta correlação entre a motilidade total, motilidade progressiva analisados pelo sistema CASA e a avaliação convencional da motilidade, analisada pela microscopia de luz (GUNZEL-APEL *et al.*, 1993; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001; RIJSSELAERE *et al.*, 2003).

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

De acordo com ARRUDA (2000), para os parâmetros motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL, BCF, STR e LIN, quanto maior for o valor obtido, melhor deverá ser a qualidade espermática, e, opostamente, para o parâmetro ALH, quanto maior o valor, pior a qualidade espermática.

AUGER *et al.* (1989) relataram grande amplitude de variação no ALH, parâmetro este citado na literatura humana como indicador do movimento de hiperativação característico da capacitação espermática. Assim, com a evolução na

análise da cinética espermática pelo sistema CASA, tornou-se possível evidenciar parâmetros que poderiam indicar a hiperativação espermática (SOUSA, 2007).

A velocidade média do percurso dos espermatozóides (VAP) neste trabalho encontra-se semelhante à velocidade encontrada por LOPES *et al.* (2009) e inferior a SILVA *et al.* (2006), já com relação ao ALH, o presente trabalho apresentou resultados, inferiores aos descritos por LOPES *et al.* (2009).

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

A associação dos marcadores fluorescentes PI e FITC-PSA, para avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, como utilizado no presente trabalho, já tinha sido estudado em espermatozóides de carneiros (SUKARDI *et al.*, 1997), humanos (CENTOLA *et al.*, 1990), equinos (ARRUDA *et al.*, 2003), bovinos (GRAHAM *et al.*, 1990) e cães (PEÑA *et al.*, 1999; MARTINS BESSA *et al.*, 2006; 2007; SHAHIDUZZAMAN & LINDE FORSBERG 2007).

De maneira geral o protocolo de fluorescência descrito no presente trabalho apresentou um padrão de fluorescência satisfatório, podendo ser realizada à leitura nos diferentes grupos, mostrando uma semelhança com o trabalho de Garner *et al.* (1997), vale ressaltar que esse autor utilizou o sêmen bovino.

Os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se acima dos descritos por (PEÑA *et al.*, 1999; MARTINS BESSA *et al.*, 2006) para populações de espermatozóides com membrana danificada e acrossoma danificado e semelhantes para a população de espermatozóides com membrana danificada e acrossoma integro. Já para a população de espermatozóides com membrana íntegra e acrossoma íntegro os valores do presente trabalho são inferiores aos (PEÑA *et al.*, 1999; MARTINS BESSA *et al.*, 2006; 2007). Vale salientar que os trabalhos citados anteriormente utilizaram diluidor diferente desse trabalho, sendo assim esse estudo foi o primeiro a utilizar associação de marcadores fluorescentes PI, FITC-PSA e R123 utilizando como diluidor o ACP-106C.

Foi evidenciado atividade mitocondrial em todos os grupos marcados com R123. A Rodamina marca regiões de cabeça e cauda do espermatozóide inespecificamente. Essas alterações podem ser devido ao comprimento de onda semelhante entre o FITC-PSA e R123 (CELEGHINI *et al.*, 2007). No entanto, SILVA *et al.* (2006) relatam que mesmo tendo um alto índice de células que apresentem membrana plasmática lesada e acrossoma danificado, não impede que o espermatozóide possa se ligar à zona pelúcida, o que pode corroborar com os resultados do presente trabalho, entretanto seria necessário a realização de mais estudos acerca do assunto.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que não há influência da temperatura de adição da dimetilformamida com a utilização do diluidor ACP-106 C, na qualidade do sêmen canino, no entanto, o glicerol mostrou-se como um crioprotetor mais adequado a ser utilizado com esse diluidor.

Tabela 1: Características (média $\pm$ erro médio padrão) da fração espermática do sêmen canino fresco (n=10 ejaculados).

Características	Média $\pm$ erro médio
Volume (mL)	0,9 $\pm$ 0,07
Concentração (n° de espermatozóides x 10 ⁶ /mL)	956,4 $\pm$ 43,02
Motilidade (%)	96,30 $\pm$ 1,00
Vigor (0 – 5)	4,75 $\pm$ 0,08
Células morfológicamente normais (%)	93,83 $\pm$ 0,43
Integridade acrossomal (%)	96,31 $\pm$ 0,61
Membranas plasmáticas funcionais (%)	91,60 $\pm$ 0,57
Espermatozóides vivos (%)	97,00 $\pm$ 1,00

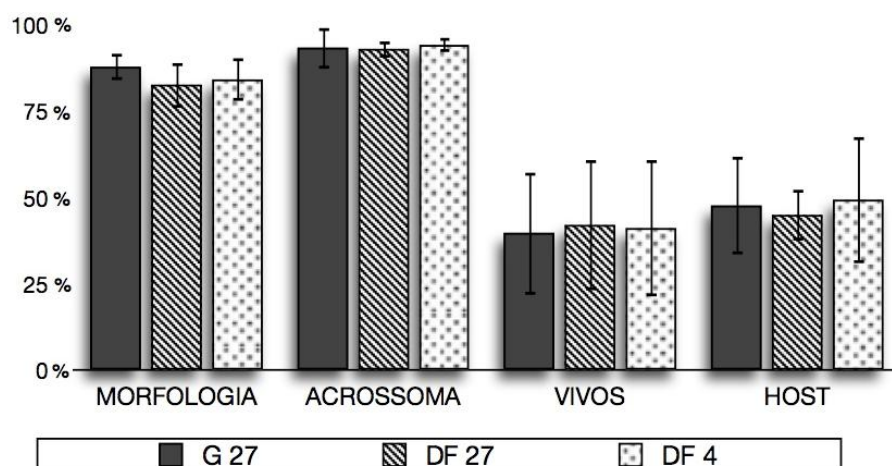


Figura 1 – Média $\pm$ erro médio padrão da morfologia espermática, integridade acrossomal, espermatozóides vivos e teste hiposmótico, pós-descongelção através da análise computadorizada submetido a diferentes temperaturas de adição de dimetilformamida ($P>0,05$).

Tabela 2: Média $\pm$ erro médio padrão de motilidade verificados por análise computadorizada do sêmen canino congelado, submetido a diferentes temperaturas de adição de dimetilformamida. (P<0,05).

Parâmetros	G27	DF27	DF4
VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	49,61 $\pm$ 21,47 ^a	34,29 $\pm$ 10,26 ^b	38,12 $\pm$ 11,93 ^{ab}
VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	32,52 $\pm$ 13,10 ^a	16,36 $\pm$ 5,39 ^b	17,70 $\pm$ 6,75 ^b
VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	39,81 $\pm$ 13,76 ^a	22,46 $\pm$ 6,44 ^b	24,79 $\pm$ 7,83 ^b
LIN (%)	59,87 $\pm$ 11,13 ^a	48,32 $\pm$ 10,18 ^b	46,13 $\pm$ 5,03 ^b
STR (%)	79,85 $\pm$ 8,36 ^a	72,39 $\pm$ 8,23 ^b	70,64 $\pm$ 6,03 ^b
ALH (μm)	2,92 $\pm$ 0,44 ^b	3,52 $\pm$ 1,38 ^a	3,67 $\pm$ 1,44 ^a
BCF (Hz)	9,90 $\pm$ 1,37 ^a	7,90 $\pm$ 2,92 ^a	8,31 $\pm$ 3,22 ^a

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística(P<0,05).

Tabela 3: Média $\pm$ erro médio padrão das subpopulações espermáticas verificados por análise computadorizada do sêmen canino congelado, submetido a diferentes temperaturas de adição de dimetilformamida (P<0,05).

Subpopulações espermáticas	G27	DF27	DF4
Sptz rápidos (%)	12.14 $\pm$ 11,41 ^a	2.33 $\pm$ 2.15 ^b	3.41 $\pm$ 2.93 ^l
Sptz médios (%)	9.28 $\pm$ 6,68 ^a	3.85 $\pm$ 3,52 ^b	5.12 $\pm$ 4,05 ^{al}
Sptz lentos (%)	32.18 $\pm$ 15,34 ^a	29.06 $\pm$ 22,56 ^a	34.62 $\pm$ 22,53 ^a
Sptz estáticos (%)	46.48 $\pm$ 26,44 ^a	64.77 $\pm$ 27,19 ^a	56.86 $\pm$ 28,50 ^a

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística(P<0,05).

Tabela 04- Média $\pm$ erro médio padrão do sêmen canino congelado, submetido a diferentes temperaturas de adição de dimetilformamida, marcados pela associação de sondas fluorescentes: PI, FITC-PSA e R123 ($P < 0,05$).

Grupos	PI ⁺ FITC-PSA ⁺ R ⁺	PI ⁺ FITC-PSA ⁻ R ⁺	PI ⁻ FITC-PSA ⁻ R ⁺
G27	66,29 $\pm$ 8,04 ^{Aa}	24,58 $\pm$ 7,70 ^{Ba}	11,55 $\pm$ 2,61 ^{Ba}
DF27	72,41 $\pm$ 4,98 ^{Aa}	14,34 $\pm$ 3,23 ^{Ba}	9,66 $\pm$ 3,70 ^{Ba}
DF4	51,76 $\pm$ 9,14 ^{Aa}	27,38 $\pm$ 8,09 ^{ABa}	19,91 $\pm$ 8,42 ^{Ba}

^{AB} letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

^{ab} letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

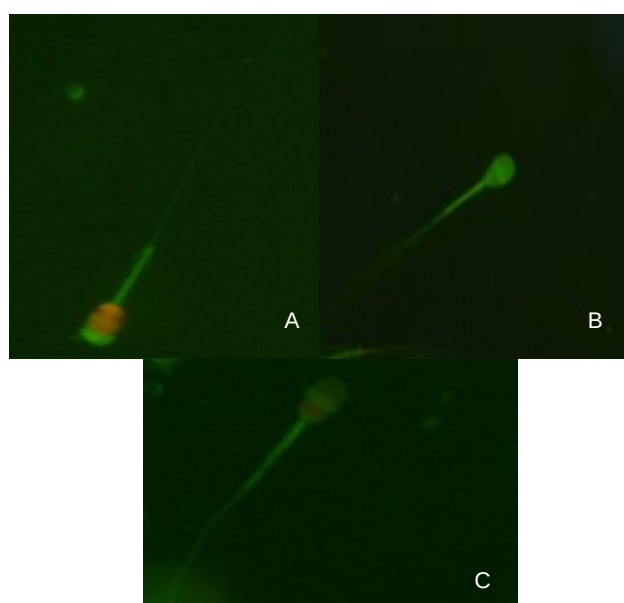


Figura 2-(A) Espermatozóide com lesão na membrana plasmática, acrossoma danificado e com atividade mitocondrial (PI⁺, FITC-PSA⁺, R⁺), (B) Espermatozóide com membrana plasmática intacta, acrossoma íntegro e com atividade mitocondrial (PI⁻, FITC-PSA⁻, R⁺), (C) Espermatozóide com lesão na membrana plasmática, acrossoma íntegro e com atividade mitocondrial (PI⁺, FITC-PSA⁻, R⁺).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIPRESTE, A.C. Criopreservação do sêmen canino, utilizando associações de crioprotetores e dois protocolos de descongelamento. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2001.

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

ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epiufluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, (supl), p.230-231, 2003.

AUGER, J.; RNOT, X.; DADOUNE, J. P. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. **Journal of Andrology**. v. 10, p. 439-448, 1989.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069, 2001.

BIANCHI, I., CALDERAM, K., MASCHIO, E.F., MADEIRA, E.M., ULGUIM, R.R., CORCINI, C.D., 2008. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology* 69, 632-638.

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

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

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

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 190f., Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO; J.RAPHAEL, C.F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479–488, 2007.

CENTOLA, G.M.; MATTOX, J.H.; BURDE, S.; LEARDY, J.F. Assessment of the viability and acrossome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Molecular of Reproduction and Development*, v. 27, n.2, p.130-135, 1990.

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

DALIMATA, A.M., GRAHAM, J.K., 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology* 49, 831-841.

DERIVAUX, J. *Reprodução dos Animais Domésticos*. Zaragoza, Editora Acribia, 1980.

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

FELDMAN, E.C; NELSON, R.W. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: FELDMAN, E.C; NELSON, R.W. **Canine and Feline endocrinology and reproduction**. 2.ed. Philadelphia: W.B Saunders Company, 2004. p.78

FUTINO, D.O., MENDES, M.C., MATOS, W.N., MONDADORI, R.G., LUCCI, C.M., 2008. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01208.x.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1401-1406, 1997.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p.55-64, 1990.

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

HOLT, W.V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *An. Reprod. Sc.* 62, 3-22.

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J.P., 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55, 671-84.

LOPES, R.F.; COSTA, L.L.M., LIMA, G.L., SOUZA, A.L.P., SILVA, A.R., 2009. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine. *Theriogenology*, 72, 650-654.

MARTINS-BESSA A, ROCHA A, MAYENCO-AGUIRRE A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in Tris-egg yolk extenders. *Theriogenology* 2006;66:2047–55.

MARTINS-BESSA A, ROCHA A, MAYENCO-AGUIRRE A. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. *Theriogenology* 2007;68:1088–96.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERUMAN, H.T. **Cryobiology**. New York: Academic Press, 1966. p.179-220.

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

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

OKUDA Y, SEITA Y, HISAMATSU S, SONOKI S, SHINO M, MASAOKA T. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Exp Anim* 2007;56:29–34.

OLIVEIRA, E.C.S. Efeito de diferentes diluidores sobre a congelação do sêmen canino. Belo Horizonte: **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal de Minas Gerais, 2003, 61p.

OLIVEIRA, E.C.S, JULIANI, G.C, MARQUES, A.P.J.R., HENRY, M. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. 2006, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 58, 6, 1116-1122.

PEÑA, A.I; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G **Flow Cytometric Assessment of Acrossomal Status and Viability of Dog Spermatozoa., Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.495–502, 1999.

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

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

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

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Effect of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1996.

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

SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrossomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**. V. 46, p. 89-96, 1997.

SANTOS, Q. T. A. **Efeito do crioprotetor sobre parâmetros espermáticos do sêmen nas diferentes etapas da criopreservação.** (2006). 58p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) Universidade Federal da Bahia, Salvador- Bahia, 2006.

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

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

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

SOUSA, D.B. **Variabilidade das sub-populações de espermatozóides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

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

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

YILDTZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. 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.

ZIMMERMANN, M, SANTOS T. E, FIDELIS A.A.G, BLUME H, MONDADORI R. G. 2007. Uso de dimetil-formamida e água de coco na congelação de sêmen canino. **Biosci. J.**, 23, 1, 96-100.

8. CONCLUSÕES

Independente da concentração de dimetilformamida utilizada ao diluidor ACP-106C e 10% de gema, proporciona resultados *in vitro* inferiores ao glicerol para a congelação do sêmen canino, não sendo indicado seu uso.

Não há influência da temperatura de adição da dimetilformamida com a utilização do diluidor ACP-106 C, na qualidade do sêmen canino, no entanto, o glicerol mostrou-se como um crioprotetor mais adequado a ser utilizado com esse diluidor.

9. PERSPECTIVAS

O aperfeiçoamento da técnica de congelação utilizando o diluidor ACP-106 C é de fundamental importância para sua posterior utilização em escala comercial. No entanto, estudos ainda são necessários para se verificar a eficiência do diluidor ACP-106 C para congelação do sêmen canino, utilizando como avaliação seminal as sondas fluorescentes.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIPRESTE, A.C. Criopreservação do sêmen canino, utilizando associações de crioprotetores e dois protocolos de descongelamento. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

ALVARENGA, M. A.; GRAHAM, J K. KEITH, SL; LANDIM-ALVARENGA FC; SQUIRS, LE. Alternative cryoprotectors for freezing satallion spermatozoa . 14th int cong. Anim. Reprod.2000; 2:157 .

ALVARENGA, M. A.; LEÃO, K. M. Hysteroscopic insemination of mares with low number of frozen thawed spermatozoa selected by percoll gradient. Theriogenology, v.58, p.651-653, 2002.

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

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J. Equine Vet. Sci., v.7, p.145-173, 1987.

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

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

ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epiufluorescência, citometria de

fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, (supl), p.230-231, 2003.

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

ASHWOOD-SMITH, M. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BBOWLER, K; FULLER, B. J. eds. *Temperature and animal cells*. Cambridge: Co. Biologists Ltda, 1987. p. 395-406.

AUGER, J.; RNOT, X.; DADOUNE, J. P. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. **Journal of Andrology**. v. 10, p. 439-448, 1989.

BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen Cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, v.21, p.1-7, 2000.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069, 2001.

BIANCHI, I., CALDERAM, K., MASCHIO, E.F., MADEIRA, E.M., ULGUIM, R.R., CORCINI, C.D., 2008. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology* 69, 632-638.

BITTENCOURT, F.R. Aspectos gerais da criopreservação do sêmen ovino. Monografia (disciplina Seminário I, do Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, 2006.

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.

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

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

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

CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., SILVA, L.D.M., CHIRINÉA, V.H., SOUZA, F.F., LOPES, M.D., 2007. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 11–16.

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

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBINS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *Journal of Andrology*, v.14, p.289-297, 1993.

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

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 190f., Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; SOUZA, L.W.O.; RODRIGUES, P.H.M.; ARRUDA, R.P. Uso de CMXRos e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozóides bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, (supl), 33, p.321, 2005

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J. RAPHAEL, C.F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479–488, 2007.

CENTOLA, G.M.; MATTOX, J.H.; BURDE, S.; LEARDY, J.F. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Molecular of Reproduction and Development*, v. 27, n.2, p.130-135, 1990.

CHALAH, T., SEIGNEURIN, F., BLESBOTS, E., 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different technique and relationship with subsequent fertility in vivo. *Criobiology* 39, 185-191.

CHIRINÉA, V.H. 2008. **Inseminação artificial com sêmen congelado em cães**. 2008. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista - Botucatu, 86p, 2008.

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

CONCANNON, P.W., BATISTA, M., 1989. Canine semen freezing and artificial insemination, in: KIRK, R.W. (Ed.), *Current Veterinary Therapy – Small Animal Practice*. Saunders, Philadelphia, pp. 1247-1259.

DALIMATA, A.M., GRAHAM, J.K., 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology* 49, 831-841.

DERIVAUX, J. *Reprodução dos Animais Domésticos*. Zaragoza, Editora Acribia, 1980.

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

FAHY, G.M., 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. Cryobiology 23, 1-13.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. Molecular reproduction and development, v.32, p.23-27, 1992.

FARRELL, P.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R. H.; DOUGLAS-HAMILTON, D. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. Fertility and Sterility, v. 64, p. 208-210, 1995.

FARRELL, P.B., PRESIW, G.A., BROCKETT, C.G., *et al.* Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. Theriogenology, v.49, p.871-979, 1998.

FARSTAD, W.; ANDERSEN-BERG, K. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. Journal of Reproduction and Fertility, v. 39, p. 289-292, 1975.

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

FELDMAN, E.C; NELSON, R.W. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: FELDMAN, E.C; NELSON, R.W. **Canine and Feline endocrinology and reproduction**. 2.ed. Philadelphia: W.B Saunders Company, 2004. p.78

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

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

FUTINO, D.O., MENDES, M.C., MATOS, W.N., MONDADORI, R.G., LUCCI, C.M., 2008. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01208.x.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of Reproduction*, v. 53, p. 276-284, 1995.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1401-1406, 1997.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reproduction Domestic Animals*, v.34, p.399-404, 1999.

GOMES, G.M.; PAPA, F. O.; JACOB, J.C.F. et al. Melhoria dos parâmetros espermáticos pósdescongelamento com o meio MP 50 para sêmen de garanhões da raça mangalarga machador. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.26, p.187-189, 2002.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p.55-64, 1990.

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

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

HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7.ed., Barueri-SP: Manole, 2004, 513p.

HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. *Archiv für experimentelle Veterinärmedizin*, v.38, p.105-114, 1984.

HANADA, A., NAGASE, H., 1980. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 60, 247-252.

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

HOLT, C., HOLT, W.V., MOORE, H.D., REED, H.C., CURNOCK, R.M., 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results o two fertility trials. *J. Androl.* 18, 312-323.

HOLT, W.V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *An. Reprod. Sc.* 62, 3-22.

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J.P., 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55, 671-84.

JAISWAL,B.S.; EISENBACH, M.; TUR-KASPA,I. Detection of parcial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: wich inducers and probes to use. *Molecular human reproduction*, v.5, p.214-219, 1999.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HAARD, M.G.M.; HAARD, M.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden. *Theriogenology*, v.52, p.641-58, 1999.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*, v.55, p.947–961, 2001.

JOHNSON, L.A., LARSSON, K., 1985. Deep freezing of boar semen. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.

JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OLSON, P.N.S., 2001. Canine and Feline Theriogenology. W.B. Saunders, Philadelphia.

KAROW, A.M., 2001. For mammalian embryologists. Cryobiology. Georgia, USA: Augusta.

KASHIWAZAKI, N., OKUDA, Y., SEITA, Y., 2006. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as crioprotectants of japanese white rabbit spermatozoa. J. Reprod. Develop., 52, 4, 511-516.

KEITH, S.L. Evaluation of new cryoprotectans for the preservation of equine spermatozoa. Colorado, EUA: Thesis (Master of Science) - Colorado State University, 1998.

KOVACS, A., FOOTE, R. H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbitspermatozoa. Biotechnic and Histochemistry, v.67, n.3, p.119-24, 1992.

KÚTYÖIGYI, G.; STEFLER, J.; KOVÁCS, A. Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. Biotechnic and Histochemistry, v.81, p.109-117, 2006.

LIMA, G.L., MOTA-FILHO, A.C., CASTELO, T.S., COSTA, L.L.M., SILVA, A.R. Uso do corante azul de bromofenol na avaliação da morfologia espermática de cães. In: FEIRA DE CIÊNCIA, CULTURA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO DO ESTADO DO CEARÁ, 3, 2007. **Anais...** Fortaleza: Pró Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa da UECE. 2007. p.1.

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. Fert. Suppl., v.39, p.299-310, 1989.

LOPES, .R.F.; COSTA, L.L.M., LIMA, G.L., SOUZA, A.L.P., SILVA, A.R., 2009. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine. *Theriogenology*, 72, 650-654.

LUKASZEWICZ, E., 2002. An effective method for freezing White Italian Garder semen. *Theriogenology*, 58, 19-27.

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

MARCHETTI, C.; JOUY, N.; LEROY-MARTIN, B.; DEFOSSEZ, A.; FORMSTECHE, P.; MARCHETTI, P. Comparison of four fluorochromes for the detection of inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction*, v. 19, p. 2267-2276, 2004.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Animal reproduction science*, v.84, p.121-133, 2004.

MARTINS-BESSA A, ROCHA A, MAYENCO-AGUIRRE A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in Tris-egg yolk extenders. *Theriogenology* 2006;66:2047–55.

MARTINS-BESSA A, ROCHA A, MAYENCO-AGUIRRE A. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. *Theriogenology* 2007;68:1088–96.

MARTINS, M.I.M. Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães. 2005. 120f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. American Journal of Physiology, v. 247, p. 125 – 142, 1984.

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

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

MEDEIROS, A.S.L., GOMES, G.M., CARMO, M.T., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A., 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. Theriogenology, 58, 273-276.

MENDONZA, C.; CARRERAS, A.; MOSS, J.; TESARIK, J. Distincion between true acrossome reaction and degenerative acrossome loss by a one-step staining method using *Pisum Sativum* agglutinin. Journal of Reproduction and Fertility, v. 95, p. 775-763, 1992.

NASCIMENTO, J. ; RAPHAEL, C. F. ; ANDRADE, A. F. C. ; ALONSO, M.A. ; CELEGHINI, E. C. C. ; ARRUDA, R.P. Effects of Sperm Concentration and Straw Volume on Motion Characteristics and Plasma, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Equine Cryopreserved Spermatozoa. Journal of Equine Veterinary Science, v. 28, p. 351-358, 2008.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERUMAN, H.T. **Cryobiology**. NewYork: Academic Press, 1966. p.179-220.

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

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: Simpósio de Biotecnologia da Reprodução de Animais Domésticos, Fortaleza-Ceará, 1, p. 53-63, 1995.

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

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

OKUDA Y, SEITA Y, HISAMATSU S, SONOKI S, SHINO M, MASAOKA T. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Exp Anim* 2007;56:29-34.

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

OLAR, T.T., BOWEN, R.A., PICKETT, B.W., 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminalnprocessing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, 31, 451-461.

OLIVEIRA, E.C.S. Efeito de diferentes diluidores sobre a congelação do sêmen canino. Belo Horizonte: **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal de Minas Gerais, 2003, 61p.

OLIVEIRA, E.C.S, JULIANI, G.C, MARQUES, A.P.J.R., HENRY, M. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. 2006, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58, 6, 1116-1122.

PAPAIOANNOU, K. Z.; MURPHY, R. P.; MONKS, R. S.; HYNES, N.; RYAN, M. P.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. *Theriogenology*. v. 48,p. 299-312, 1997.

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

PEÑA, A.I; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G **Flow Cytometric Assessment of Acrossomal Status and Viability of Dog Spermatozoa., Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.495–502, 1999.

PEÑA-MARTINEZ, I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci*, v.82- 83, p.209-224, 2004.

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.

PINEDA, M.H., KAINER, R.A., FAULKNER, L.C. (1989). Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. *American Journal of Veterinary Research*, 34, 1487-1491.

PLATZ, C.C.; SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Laboratory Animal Science*, v.27, n.6, p.1013-1016, 1977.

QUINTANILHA, A. M. P. N. Inseminação artificial e sêmen congelado. In: NELSON, R. W.; COUTO, C.G. **Fundamentos de medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Roca, 1994. Cap. 12, p. 526-529.

QUINTELA, A.T., GUSMÃO, A.L., LOPES, M.D., SILVA., 2004. Hyposmotic test with distilled water to evaluate sperm plasma membrane integrity of dog semen – preliminary data. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, BRAZIL, 15, 2004, Porto Seguro, Anais..., Porto Seguro, p.518.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, v. 59, p. 1973-1990, 2003.

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

RESENDE, M.V. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade contínuo de Percoll e Optiprep. 2007. 63f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

REVEL, S.G., MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. Anim. Reprod. Sci. v.36, p.77-86, 1994.

ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C., VANOZZI, J., ROMAGNOLI, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 1998. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. Reprod. Dom. An., 38, 355-361.

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

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

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

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

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Effect of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1996.

ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C., VANOZZI, J., ROMAGNOLI, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 1998. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. *Reprod. Dom. An.*, 38, 355-361.

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

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, v.38. p. 1-36, 1995.

SAMPAIO NETO, J. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J. F. Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen eqüino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Supl n.5, p.137-139, 2002.

SANTOS, Q. T. A. **Efeito do crioprotetor sobre parâmetros espermáticos do sêmen nas diferentes etapas da criopreservação.** (2006). 58p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) Universidade Federal da Bahia, Salvador- Bahia, 2006.

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

SEAGER, S.W.J.; FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. *Laboratory Animal Science*, v.22, p.177-182, 1972.

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

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. *Ciência Rural*, v. 6, p.1021-1025, 2000.

SILVA, A.R. Otimização de uma metodologia para a congelação do sêmen canino diluído em tampão Tris. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2001.

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M., 2003. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Ver. Port. Ci. Vet.*, 98, 546, 53-60.

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

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M., 2005. Influence of temperature during glicerol addition and post-thaw diluitin on the quality of canine frozen semen. *Reprod. Dom. An.*, 40, 1-5.

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

SLOTT, V.L., JEFFAY, S.C., DYER, C.J., BARBEE, R.R., PERREAULT, S.D., 1997. Sperm motion predicts fertility in male hamsters treated with alpha-chlorohydrin. *J Androl.*, 18, 708-716.

SMITH, A.H., POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, v.166, p.668-671, 1950.

SNOECK, P. P. N. Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade. Belo Horizonte, MG: UFMG. 2003, 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

SORRIBAS, C.E., 1995. Reproduccion em los pequeños animales. Ed. Intermedica, BuenosAires.

SOUSA, D.B. **Variabilidade das sub-populações de espermatozóides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

SOUZA, N.L. Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozóides criopreservados eqüinos. 76 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.

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

SQUIRES, E. L. et al. Cooled and Frozen Stalion Semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. [Apostila].

SQUIRES, E.L., KEITH, S.L., GRAHAM, J.K., 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62, 1056-1065.

STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H., DICKEY, D., 1997. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, 3rd ed. McGraw-Hill, New York.

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

SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrossomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science.** V. 46, p. 89-96, 1997.

TARDIF, A. L.; FARRELL, P. B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R. H. Computerassisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5° C. *Journal of dairy science*, v. 80, p. 1606-1612, 1997.

THOMAS, C.A.; GANER, D.L.; DEJARNETE, J.M.; MARSHALL, C.E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v.58, p.786-793, 1998.

TROIANO, L.; GRANATA, A.R.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Experimental Cell Research*, v.241, p.384-393, 1998.

TSELUTIN, K., SEIGNEURIN, F., BLESBOTIS, E., 1999. Comparison of crioprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Sc.*, 78, 4, 586-590.

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

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

VALCÁRCEL, A.; de las HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Animal reproduction science*, v. 45, p. 299-309, 1997.

VERTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149 179.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling, Proceedings, 1st. Int. Conf. On Deep Freezing of Boar Semen, p. 113 – 127, 1985.

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

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

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

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology*, v.66, p.159-165, 2006.

ZIMMERMANN, M, SANTOS T. E, FIDELIS A.A.G, BLUME H, MONDADORI R. G. 2007. Uso de dimetil-formamida e água de coco na congelação de sêmen canino. *Biosci. J.*, 23, 1, 96-100.

11. Anexos

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

20 mL de água destilada
0,58 g de citrato de sódio
0,8 mL de formaldeído
0,3 g de Rosa de Bengala

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

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

0,1 g de azul de bromofenol
0,4 g de citrato de sódio
10 mL de água destilada

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

4,25 g ACP-106[®]
50 mL de água destilada

OBS.: pH 7,07 e osmolaridade de 440 mOsm.

Anexo D: Diluição e preparo das sondas soluções fluorescentes para avaliação das membranas espermáticas (CELEGHINI, 2005)

IODETO DE PROPÍDIO – PI

(Sigma-Aldrich 28,707-5, frasco com 25 mg)

Solução Estoque: 25 mg/mL PI + 1,0 mL DMSO

Solução de Trabalho: 0,5 mg/mL

20 µL da Solução Estoque de PI (25mg/mL) + 980,0 µL de PBS

Obs: Aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.

FITC-PSA

(Sigma L-0770, frasco com 2 mg 2,0 mg)

Solução de Trabalho: 100 µg/mL

2 mg de FITC-PSA + 20 mL de DPBS + 10% de Azida de Sódio 10%

Obs: Aliquotar e manter resfriado a 4°C e protegidas da luz.

RODAMINA 123 (R123, Molecular Probes, R-302-25mg)

Solução de estoque: (DMSO) – 5 mg/mL

Solução de trabalho: (DMSO)- 0,2 mg/mL (0,53mM)

Obs: Armazenar em freezer, no escuro

**Anexo E. Reposta da submissão do artigo 1 pelo editor da revista Animal
Reproduction Science**
