

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
AMARILDO MARCIANO ROSA

USO DA SÍLICA COLOIDAL EQUINA NO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN
CANINO

Alfenas – MG

2018

AMARILDO MARCIANO ROSA

USO DA SÍLICA COLOIDAL EQUINA NO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN
CANINO

Tese apresentada à Universidade José do Rosário Vellano,
como parte das exigências do Doutorado em Reprodução,
Sanidade e Bem-estar Animal para a obtenção do título de
Doctor Scientiae.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Augusta Pagnano Derussi

Alfenas – MG

2018

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
Biblioteca Central da UNIFENAS

Rosa, Amarildo Marciano

Uso da sílica coloidal equina no processo de congelação do sêmen canino / Amarildo Marciano Rosa. — Alfenas, 2018. 52f.

Orientador: Prof.^a Dra. Ana Augusta Pagnano Derussi

Tese (Doutorado) – Programa de Doutorado em Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2018.

1. Centrifugação. 2. Criopreservação. 3. Morfologia.
I. Universidade José do Rosário Vellano. II. Título

CDU 636.7:612.6(043.3)

Samira Vidal da Silva Ramos
Bibliotecária CRB6 3474



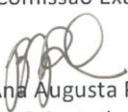
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

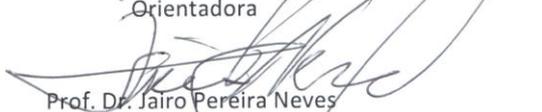
Título: "USO DA SÍLICA COLOIDAL EQUINA NO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN CANINO".

Autor: Amarildo Marciano Rosa

Orientador: Profa. Dra. Ana Augusta Pagnano Derussi

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **DOCTOR EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL** pela Comissão Examinadora.


Profa. Dra. Ana Augusta Pagnano Derussi
Orientadora

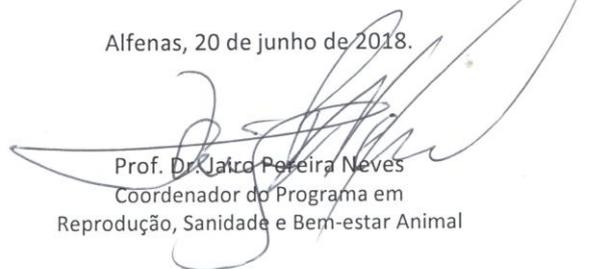

Prof. Dr. Jairo Pereira Neves


Prof. Dr. Miller Pereira Palhão


Prof. Dr. Pedro Ivo Sodré Amaral


Profa. Dra. Erika Kristina Incerpi Garcia

Alfenas, 20 de junho de 2018.


Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Coordenador do Programa em
Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sebastião Marciano Rosa e Amy Chagas Rosa e aos meus irmãos Adilson Marciano Rosa, Magali Rosa Souza e Miriam Rosa Mambelli, pelos exemplos, apoio, presença e amor a mim dedicados;

À minha esposa, Juliana Mendonça Chagas Rosa, pelo amor, incentivo e companheirismo;

Aos meus filhos, Beatriz Mendonça Chagas Rosa e Ivan Mendonça Chagas Rosa, pela motivação em ser melhor, a cada dia;

Aos animais que, dignamente, contribuíram para o bem da ciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus , que é fonte de saúde, sabedoria e disposição para o trabalho diário, pela possibilidade da realização deste projeto;

À Profa. Dra. Ana Augusta Pagnano Derussi, pelo profissionalismo, exemplo, dedicação nas correções e orientações neste período de aprendizado;

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Prof. Dr. Jairo Pereira Neves, por mostrar os caminhos a percorrer na realização das pesquisas;

Aos Professores e funcionários da Unifenas, em particular ao Gilson Aparecido de Almeida, pela atenção e transmissão de conhecimentos,;

À Profa. Dra. Marilu Martins Gioso, pela idealização deste projeto de pesquisa;

Aos colegas da pós-graduação ,que tornaram mais leve este período de crescimento profissional, especialmente ao Me. Hugo Pieve Darcádia;

À Universidade José do Rosário Vellano-UNIFENAS, pela concessão do laboratório e materiais de consumo para a realização dos trabalhos;

À Universidade Federal de Lavras-UFLA, pela disponibilização de seus laboratórios, representada pelo Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo e sua aluna orientada na Pós-graduação, Ma. Bárbara Azevedo Pereira Torres, pela instrução e auxílio na manipulação dos aparelhos ;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos;

À banca examinadora, pela presença.

“Tudo o que a sua mão encontrar para fazer, faça-o com todo o seu
coração”

Jesus Cristo

RESUMO

Rosa, Amarildo Marciano. **Uso da sílica coloidal equina no processo de congelação do sêmen canino**. Orientadora: Ana Augusta Pagnano Derussi. Alfenas: UNIFENAS, 2018. Tese (Doutorado em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal).

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do uso da centrifugação em camada única de sílica coloidal de glicidoxipropiltrimetoxissilano- formulação equina-Androcoll-E® (Minitube, Germany), na congelação do sêmen canino. Para isso, 5 cães, de raças distintas, com características seminais satisfatórias (CBRA, 2013) foram utilizados. Sete ejaculados/animal foram coletados e subdivididos, formando: Grupo A- amostras centrifugadas a 300g, por 10 minutos, utilizando Androcoll-E® e grupo E- amostras centrifugadas a 700g, por 10 minutos, utilizando o meio CaniPlus Enhance® (*Minitube; Germany*). Em ambos os grupos foram realizadas as etapas de descarte do sobrenadante, ressuspensão do pellet em CaniPlus Enhance® (1mL de meio/100 x 10⁶ espermatozoides), envase (25 x 10⁶ espermatozoides móveis/palheta), refrigeração (2 a 6°C por 2 horas), congelação (20 minutos a 5cm sobre vapor de N₂ e armazenamento a -196°C em botijão de N₂) e descongelação (a 37°C por 60 segundos). Após 7 dias, as amostras foram ressubmetidas à centrifugação, formando 4 subgrupos (16 palhetas/animal/subgrupo): AA (centrifugação com Androcoll-E® na etapa de pré e pós descongelação), AE (centrifugação com Androcoll-E® na etapa pré congelação e com CaniPlus Enhance® na pós descongelação), EA (centrifugação com CaniPlus Enhance® na pré congelação e com Androcoll-E® na pós descongelação) e EE (centrifugação com CaniPlus Enhance® nas etapas pré e pós descongelação). A análise microscópica do sêmen (concentração, vigor, integridade de membrana, morfologia espermática, motilidade subjetiva e computadorizada) foi realizada. Teste de variância, Tukey e Kruskall Wallis foram usados, considerando p<0,05. Houve diferença estatística em relação à motilidade computadorizada e morfologia espermática. A velocidade média da trajetória e curvilínea foram superiores no grupo EE, o batimento flagelar cruzado e a retilinearidade no grupo EA e a linearidade no grupo AA. Em relação à morfologia espermática, o grupo EA foi o que apresentou maior porcentagem de células morfologicamente íntegras (95%) enquanto no grupo AE, os defeitos menores (23%) e maiores foram superiores aos aceitáveis (12%). O uso da centrifugação com sílica coloidal equina pós descongelação (grupo EA) seleciona espermatozoides morfologicamente íntegros, que apresentam parâmetros que indicam melhor capacidade de migração e penetração no muco cervical.

Palavras-chave: Centrifugação. Criopreservação. Morfologia.

ABSTRACT

Rosa, Amarildo Marciano. **Use of equine colloidal silica in the process of freezing the canine semen**. Advisor: Ana Augusta Pagnano Derussi. Alfenas: UNIFENAS, 2018. Thesis (PhD in Reproduction, Health and Animal Welfare).

The objective of this study was to evaluate the influence of the use of single-layer colloidal silica of glycidoxypropyltrimethoxysilane-equine formulation-Androcoll-E® (Minitube, Germany) on the freezing of canine semen. For this, 5 dogs, of different breeds, with satisfactory semen characteristics (CBRA, 2013) were used. Seven ejaculates / animal were collected and subdivided, forming: Group A - samples centrifuged at 300g for 10 minutes using Androcoll-E® and group E samples centrifuged at 700g for 10 minutes using CaniPlus Enhance® medium (Minitube; Germany). In both groups, the steps of discarding the supernatant, resuspension of the pellet in CaniPlus Enhance® (1mL of medium / 100×10^6 spermatozoa), packaging (25×10^6 spermatozoa / pallet), refrigeration (2 to 6°C for 2 hours), freezing (20 minutes at 5cm over N₂ vapor and storage at -196C in N₂ canister) and thawing (at 37 ° C for 60 seconds). After 7 days, the samples were resubmitted to centrifugation, forming 4 subgroups (16 straws / animal / subgroup): AA (Androcoll-E® centrifugation in the pre- and post-thawing stage), AE (Androcoll-E® centrifugation at pre-freezing stage and CaniPlus Enhance® in post-thawing), EA (CaniPlus Enhance® centrifugation in pre-freezing and with Androcoll-E® after thawing) and EE (CaniPlus Enhance® centrifugation in pre and post-thaw stages). Microscopic analysis of semen (concentration, vigor, membrane integrity, sperm morphology, subjective and computerized motility) was performed. Test of variance, Tukey and Kruskal Wallis were used, considering $p < 0.05$. There was a statistical difference in relation to computerized motility and sperm morphology. The mean trajectory velocity and curvilinear velocity were higher in the EE group, the cross flagellar beating and the rectilinearity in the EA group and the linearity in the AA group. In relation to sperm morphology, the EA group presented the highest percentage of morphologically intact cells (95%), whereas in the AE group, minor defects (23%) and higher were greater than acceptable (12%). The use of equine colloidal silica after thawing (EA group) selects morphologically intact spermatozoa, which present parameters that indicate a better migration capacity and penetration into the cervical mucus.

Keywords: Centrifugation. Cryopreservation. Morphology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Formação dos subgrupos para centrifugação pós-descongelamento.....31

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Formação dos subgrupos para centrifugação pós-descongelamento.....41

Figura 2 - Comparação entre os intervalos de confiança para as medianas (IC=95%) dos protocolos experimentais (AA: Centrifugação com Androcoll-E® antes e após o congelamento; AE: Centrifugação com Androcoll-E® somente antes do congelamento; EA: Centrifugação com Androcoll-E® somente após do congelamento; AA: Centrifugação sem Androcoll-E® antes e após o congelamento) referentes à porcentagem de espermatozoides normais (a), com cabeça e cauda livres (b), com cauda enrolada (c) e cauda fortemente enrolada (d).....43

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Características do ejaculado de cães, coletados pelo método da manipulação digital, considerado normal pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA,2013).....	19
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Valores para as medianas (intervalo interquartil) referentes à concentração espermática, a motilidade subjetiva e ao vigor espermático de doses de sêmen canino preparadas com ou sem o uso de Androcoll-E [®] no processo de centrifugação.....	33
---	----

Tabela 2 - Valores referentes à análise computadorizada da motilidade de doses de sêmen canino preparadas com ou sem o uso de Androcoll-E [®] no processo de centrifugação, sendo VCL (velocidade curvilínea), VSL (velocidade linear progressiva), VAP (velocidade média da trajetória), LIN (linearidade), STR (retilinearidade), WOB (índice de oscilação), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça) e BCF (frequência de batimento flagelar cruzado).....	34
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Valores para as medianas (intervalo interquartil) referentes à integridade de membrana, obtidas na avaliação de doses de sêmen canino preparadas com ou sem o uso de Androcoll-E [®] no processo de centrifugação.....	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- %: Porcentagem
- >: Maior
- <: Menor
- =: Igual
- ±: Mais ou menos
- ®: Marca registrada
- µL: Microlitro
- µm: Micrômetro
- A+A: Androcoll-E+Androcoll-E
- A+E: Androcoll-E+Enhance
- ABINPET: Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação
- ALH: Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
- Androcoll-C: Sílica Coloidal específica para cães
- Androcoll-E> Sílica Coloidal específica para equinos
- BCF: Frequência de batimento flagelar
- CASA: *Computer Assisted Sperm Analysis* (Análise computadorizada de sêmen)
- CBRA: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
- CFDA: Carboxifluoresceína
- cm: Centímetro
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico
- E+A: Enhance+Androcoll-E
- E+E: Enhance+Enhance
- g: Força centrífugarelativa
- HOS: Teste hiposmótico
- I.P: Iodeto de Propídio
- I.A.: Inseminação Artificial
- LIN: Linearidade
- mL: Mililitro
- n: Nú
- mero n°: Número
- o: Grau
- °C: Graus Célsius
- Pet: Animal de estimação
- pH: Potencial Hidrogeniônico
- S: Segundo
- SLC: *Single Layer Centrifugation* (Centrifugação de camada única)
- STR: Retilinearidade
- Swab: Esfregaço
- TES: Tampão eletrolítico
- TRIS: Tri-hidroximetilaminometano
- VAP: Velocidade média de trajetória
- VCL: Velocidade curvilínea
- VSL: Velocidade linear progressiva
- WOB; Índice de oscilação
- X: multiplicação

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	13
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Coleta e Avaliação seminal.....	15
2.1.1 Aspectos estruturais do espermatozoide.....	18
2.2 Criopreservação do sêmen: componentes do meio diluidor, crioprotetores e utilização na IA canina.....	19
2.3 Centrifugação coloidal de sêmen.....	21
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 HIPÓTESE.....	22
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO 2.....	28
CAPÍTULO 3.....	38

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A relação de afetividade entre humanos e cães é vista como reflexo do processo de modernização das cidades e da individualização, logo é esperado que haja o crescente aumento no número de canis, de produtos e de serviços destinados a esse segmento. O Mercado Pet tem mostrado um alto potencial lucrativo dentro do cenário nacional, já que segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, São Paulo/SP), o Brasil é a quarta maior nação do mundo em população total de *pets*, a segunda em números de cães e gatos e a terceira colocada em faturamento mundial no ano de 2016.

A importância da espécie canina igualmente ocorre na área da pesquisa científica, pois é vista como um excelente modelo experimental para estudos destinados à preservação de canídeos selvagens ameaçados de extinção (SILVA et al., 2001).

Deste modo, a exigência de serviços especializados e o aperfeiçoamento das biotécnicas reprodutivas existentes são constantemente requeridos, a fim de se realizar uma acurada seleção e preservação de material genético de cães de alto valor zootécnico e/ou afetivo. Dentre as diferentes biotécnicas reprodutivas, tem-se destacado a criopreservação de sêmen.

A criopreservação de sêmen possibilita diversas vantagens, tais como o melhor aproveitamento do sêmen coletado através de seu fracionamento, a manutenção da capacidade fecundante por um período indeterminado de tempo, a diminuição do estresse causado pelo transporte do animal e a facilitação da propagação do material genético para diferentes regiões (LINDE-FORSBERG e FORSBERG, 1993; SILVA et al., 2001), no entanto, apesar de todas essas aplicabilidades, a utilização do sêmen canino congelado no Brasil, praticamente restringe-se a laboratórios de pesquisa.

A sua pouca utilização ocorre principalmente devido a sua baixa taxa de concepção, fato que é atribuído tanto ao processo da manipulação seminal, como também às injúrias causadas ao sêmen na congelação, diminuindo assim, sua viabilidade espermática pós-descongelação.

Para amenizar tais injúrias provocadas pela ação dos crioprotetores, tem sido estudada a utilização de coloides em uma única camada para a centrifugação de sêmen, com o intuito de melhorar a viabilidade de células espermáticas pré e pós-descongelação, obtendo

melhorias nos padrões de qualidade espermática (DORADO et al., 2013), no entanto, poucos estudos foram realizados utilizando esta metodologia na espécie canina. A técnica baseia-se na centrifugação de sêmen diluído através de uma coluna de sílica revestida com um coloide de glicidoxipropiltrimetoxissilano (Androcoll®), onde há a separação dos espermatozoides do plasma seminal, havendo, assim, a seleção dos espermatozoides que são móveis, viáveis e com boa integridade de cromatina (PERTOFT, 2000).

O uso da sílica coloidal espécie-específica (Androcoll-C®), foi iniciado por Morrell et al. (2008^a), porém, esta não é disponibilizada no mercado brasileiro, o que torna a sílica coloidal equina (Androcoll-E®) uma alternativa plausível para a realização de um processo de seleção de espermatozoides através da centrifugação coloidal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Coleta e avaliação seminal

A coleta do sêmen canino pode ser realizada tanto pela manipulação digital, quanto pela eletroejaculação (CHRISTIANSEN, 1988). A manipulação é realizada de forma contínua, sendo interessante o condicionamento prévio do animal à técnica (FELDMAN e NELSON, 1996).

No processo de eletroejaculação, estando o cão sob sedação, são aplicados uma série de pulsos curtos e de baixa voltagem, emitidos por probe específica colocada na região anal, os quais estimularão nervos pélvicos envolvidos na resposta ejaculatória (JOHNSTON et al., 2001). Trata-se de uma técnica aplicada quando há insucesso na coleta por manipulação digital, ou em casos de machos com patologias locomotoras, quadros clínicos dolorosos e ausência de libido (KUTZLER, 2005).

O ejaculado canino apresenta três frações distintas. A primeira fração, chamada de pré-espermática, é de origem prostática e possui um aspecto aquoso, incolor, com pH variando de 6,2 a 6,5 e volume médio de $2,4 \pm 1,8$ mL. A segunda fração, chamada de porção espermática, é rica em espermatozoides, apresenta um aspecto que varia de branco opalescente ao marfim, com pH situando-se entre 6,3 a 6,6 e volume médio de 0,5 a 4 mL. A terceira fração, de origem prostática, tem a função de facilitar o transporte espermático pelo cérvix e aumentar o volume do ejaculado, apresenta um aspecto que varia de aquoso a transparente e seu pH oscila entre 6,5 e 7,0 (JOHNSTON et al., 2001).

As abordagens convencionais para a avaliação do sêmen compreendem as análises macroscópica e microscópica. Na análise macroscópica são avaliados volume, cor, aspecto e odor da amostra, já na análise microscópica são definidos a motilidade, o vigor, a concentração e a morfologia espermática (CBRA, 2013).

O volume espermático é medido por leitura direta no tubo coletor graduado e a coloração do sêmen é avaliada por inspeção visual, onde, considerado normal é o sêmen de coloração branca opalescente (KRUSTRITZ, 2010). O sêmen canino possui aspecto viscoso e odor considerado *sui generis* (SILVA et al., 2002)

Na avaliação dos parâmetros microscópicos, segundo Derivaux (1980), a motilidade espermática, ou seja, o percentual de espermatozoides móveis em uma amostra, é utilizada

como principal parâmetro para avaliação de qualidade espermática na espécie canina (IVANOVA-KICHEVA et al., 1997), no entanto, esta correlação não está totalmente elucidada (SILVA et al., 2003), uma vez que o percentual de espermatozoides móveis está estritamente relacionado com o percentual de células morfológicamente normais (AGARWAL et al., 2003).

A análise da motilidade espermática pode ser realizada forma subjetiva (manual) com auxílio de microscopia óptica de luz (SEAGER e FLETCHER, 1972) ou de forma computadorizada (HTR-IVOS ANALYSER, Hamilton Thorn Research). Apesar dos resultados serem similares em ambas metodologias (RIJSSELAERE et al., 2003), é importante ressaltar que a análise computadorizada propicia uma melhor acuidade, exclui a influência do analisador (IGUER-OUADA e VERSTEGEN, 2001), fornece um maior número de informações e classificações relacionadas ao movimento espermático, tais como: porcentagens de espermatozoides em velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR) , linearidade (LIN), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) (MORTIMER, 2000).

O vigor espermático é caracterizado como a intensidade do movimento dos espermatozoides móveis (motilidade) e é classificado em uma escala de 0 – 5 (JOHNSTON et al., 2001), sendo 0: todos os espermatozoides sem movimento, 1: espermatozoides com movimentos lentos, látero-laterais, sem progressão, 2: espermatozoides rápidos, com movimentos látero-laterais, sem progressão, 3: espermatozoides com rápidos movimentos látero-laterais, com ocasional progressão, 4: espermatozoides lentos e contínua progressão e 5: espermatozoides rápidos e contínua progressão. Movimentos anormais em sentido retrógrado ou em círculo estão muitas vezes relacionados a anormalidades morfológicas de peça intermediária e cauda (JOHNSON, 2006).

A concentração espermática é referente a relação entre número de espermatozoides e a quantidade em mililitro de plasma seminal, sendo que normalmente cães maiores produzem mais espermatozoides que os menores (ROOT e JOHNSTON, 1994). Vannucchi et al., (1998) relataram que a idade, a atividade reprodutiva do macho, o método de colheita e a diluição do plasma seminal entre outros fatores também influenciam na quantidade de espermatozoides no ejaculado.

A morfologia espermática pode ser analisada através da realização de esfregaços úmidos ou corados (CARDOSO et al., 2016) e diversos corantes já foram utilizados para

sêmen canino, tais como: Eosina-nigrosina (CBRA, 2013), Diff-Quik (JOHNSTON et al., 2001), Spermac® (OETTLÉ, 1993), Giemsa (CARDOSO et al., 2003), Hematoxilina-eosina (SILVA et al., 2003) e Karras modificado por Papa et al. (1988).

Segundo Verstegen et al. (2002) e Garcia-Herreros et al. (2006), a morfologia espermática é um importante indicador de fertilidade, tanto em homens quanto em animais e demonstra danos espermáticos causados por agentes físicos ou químicos. Oettlé (1993) relata que, à medida em que o percentual de espermatozoides anormais aumenta, a fertilidade é reduzida, sendo observado que, quando a proporção de espermatozoides morfolologicamente normais está abaixo de 60%, a fertilidade é adversamente afetada.

De acordo com os danos que as alterações causam à função espermática, os defeitos podem ser considerados maiores ou menores e segundo Blom (1973), os defeitos maiores incluem anormalidades correlacionadas com prejuízos de fertilidade ou com uma condição patológica do testículo ou epidídimo, dentre elas: o subdesenvolvimento de cabeças, as formas duplas, Knobbed sperm, decapitados, diadema, cabeças piriformes, estreitas na base, cabeça com contorno anormal, cabeça pequena anormal, cabeça destacada anormal, peça intermediária em saca-rolhas, defeitos de peça intermediária, gota proximal, cauda fortemente dobrada ou enrolada.

Os defeitos menores parecem ter um menor efeito negativo na fertilidade, (OETTLÉ e SOLEY, 1988) e compreendem outros desvios de forma, aparentemente de menor importância, como cabeça delgada, cabeça pequena normal, cabeça gigante, curta e achatada, cabeça normal destacada, acrossomo destacado, inserção abaxial, gota distal, cauda dobrada ou enrolada, e cauda enrolada na extremidade (Blom, 1973). Segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013)-CBRA, a proporção de defeitos maiores e menores somados no sêmen canino não deve ultrapassar o máximo de 20%, e o total de defeitos maiores não deve ser superior a 10%.

A integridade da membrana plasmática é essencial ao processo de fertilização (CHIRINÉA et al., 2003), uma vez que está relacionada a mecanismos fisiológicos da manutenção da viabilidade espermática no trato reprodutor da fêmea, capacitação espermática e fertilização (MOCÉ E GRAHAM, 2008). A avaliação da mesma pode ser realizada tanto pelo teste hiposmótico (QUINTELA et al., 2010), quanto pela associação das sondas fluorescentes (JEYENDRAN et al., 1992).

Em 2013, foi estabelecido os parâmetros de qualidade para sêmen de cão de acordo com o CBRA, sendo considerável aceitável as características do ejaculado descritas na tabela 1.

Tabela 1- Características do ejaculado de cães, coletados pelo método da manipulação digital, considerado normal pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013)

CARACTERÍSTICAS	VALORES
Volume total	1,5 a 80 mL
1ª fração	0,5 a 5,0 mL/transparente e aquosa
2ª fração	1,0 a 4,0 mL/serosa a leitosa
3ª fração	1,0 a 80,0 mL/transparente e aquosa
Cor	branca acinzentada
Odor	“ <i>sui generis</i> ”
Movimento de massa	ausente
Motilidade espermática	≥70%
Vigor	≥3
Concentração espermática	20 x 10 ⁶ /mL a 300 x 10 ⁶ /mL
Espermatozoides morfolologicamente normais	≥70%

2.1.1 Aspectos estruturais do espermatozoide

A célula espermática pode ser dividida em duas estruturas distintas: cabeça e cauda. A cabeça possui forma, tamanho e estrutura que pode variar entre as espécies (SIQUEIRA, 2004). A característica principal da cabeça do espermatozoide é o núcleo achatado de forma oval contendo a cromatina altamente condensada. Na extremidade anterior do núcleo espermático está o acrossoma, uma estrutura essencial para iniciar a reação físico-química do processo de fertilização (BARTH e OKO, 1989).

A cauda do espermatozoide é composta pelo colo, peça intermediária principal e terminal. A parte central da peça intermediária juntamente com o comprimento total da cauda forma o axonema. Esse conjunto é recoberto externamente por várias mitocôndrias, dispostas em forma de hélice, que geram a energia necessária para a motilidade espermática (BEDFORD e HOSKINS, 1990). A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide e é composta por camadas lipídicas (fosfolipídios, colesterol e glicolipídios) e proteicas (ALBERTS et al., 1997). O colesterol é o principal componente lipídico presente nas membranas celulares de mamíferos e possui ação fundamental na modulação da fluidez e na estabilidade da bicamada lipídica, pois liga-se aos fosfolipídios de membrana, sendo que,

quanto maior a quantidade de colesterol presente, menos flexível e/ou fluida é a membrana (AMANN e PICKETT, 1987; PARKS, 1997) e maior é a resistência desse espermatozoide ao choque térmico (VALLE e SILVA FILHO, 2001)

A membrana plasmática contribui para a manutenção do meio intracelular (equilíbrio osmótico), agindo como um sensor de sinais externos (ambientais e de outras células), auxiliando no transporte de moléculas específicas e participando de reações catalíticas (ALBERTS et al.,2008). Portanto, é uma estrutura fundamental à capacidade fertilizante do espermatozoide, o que significa que lesões na mesma podem levar a perda da homeostase e morte celular (FLESH e GADELLA, 2000).

2.2 Criopreservação do sêmen: componentes do meio diluidor, crioprotetores e utilização na IA canina

Visando um melhor e maior aproveitamento de animais com alto potencial genético e reprodutivo, o transporte do sêmen a longas distâncias e formação de bancos de germoplasma, tanto de animais em risco de extinção como daqueles que não podem ser utilizados na reprodução por razões temporárias ou permanentes, a biotecnologia de criopreservação de sêmen veio ao encontro da reprodução animal, proporcionando a suspensão do metabolismo espermático e a manutenção de suas características, por tempo prolongado , enquanto mantido em nitrogênio líquido (PESCH e HOFMAN, 2007; BERTOZZO e ZÚCCARI, 2008).

Avaliação, diluição, envase, refrigeração, congelação, armazenamento e descongelação são as etapas pelas quais o sêmen é submetido no processo de criopreservação, sendo que cada etapa está relacionada à estrutura funcional e ao metabolismo celular das membranas. A interação entre diluidor, crioprotetores e curvas de resfriamento busca minimizar os danos causados pelo choque frio, pela desidratação celular e pela formação de cristais de gelo (CELEGHINI, 2005). Entretanto, segundo Watson (2000) e Ohashi (2001), mesmo com as melhores técnicas de criopreservação, obtém-se ainda, em média, apenas 50% de viabilidade espermática pós-descongelação, acreditando que a qualidade do ejaculado, os métodos de congelação, os tipos de diluidores, o tipo de envasamento (mini-palheta, palheta média, ampola, pellets) e os métodos de congelação sejam os responsáveis por esses índices e que as injúrias possam ocorrer nas diferentes etapas de congelação descongelação.

O início do estresse térmico no processo de criopreservação ocorre no momento da refrigeração, pois, se realizada de forma rápida, induz ao choque frio, que é caracterizado pela queda irreversível da motilidade espermática e alterações na estrutura da membrana, gerando um rearranjo dos fosfolipídios, passando do estado líquido para gel, levando ao aumento da permeabilidade da célula (STORNELLI et al., 2005). Moraes et al. (2010) observaram que a relação colesterol/fosfolipídios de membrana é menor em espécies mais sensíveis ao choque frio e à criopreservação.

O estresse físico e químico causado pela criopreservação também diminui irreversivelmente a motilidade espermática, provoca aumento da degeneração do DNA e liberação intracelular de enzimas, lipídeos e proteínas. A formação de cristais de gelo intracelular durante a criopreservação e descongelação, faz com que haja aumento da concentração intracelular de soluto e gere lesões celulares, afetando a estrutura celular, de forma direta, pela ruptura de membranas, ou indireta, pela alteração das funções celulares, através do processo metabólico (HOLT, 2000; BRANDÃO et al., 2006), desnaturando proteínas, gerando assim, danos irreversíveis (AMANN e PICKETT, 1987). Sendo assim, a velocidade do processo de congelação e descongelação é de extrema importância (HOLT, 2000) na criopreservação e, quando realizada de maneira lenta, foi a que apresentou os melhores resultados. Deste modo, ocorre a fusão dos cristais de gelo extracelulares diluindo, assim, os solutos e também a reidratação lenta das células, evitando, assim, a formação dos cristais de gelo. Hori et al. (2006) obtiveram seus melhores resultados na realização da criopreservação com a permanência do sêmen a 7cm do nível de N₂ líquido, por 10 minutos.

Os diluentes para congelação de sêmen devem possuir nutrientes, como fonte de energia (glicose, glicina), e tampões, contra mudanças de pH (TRIS- ácido cítrico, TES-citrato). Deve também apresentar-se com osmolaridade e concentração de eletrólitos próximas às fisiológicas, conter antibióticos, para prevenção de crescimento bacteriano (penicilina, estreptomicina, neomicina, amicacina), possuir componentes que garantam proteção contra o choque térmico durante a refrigeração (gema de ovo ou leite), além da presença de crioprotetores (glicerol, etilenoglicol), os quais reduzem os danos aos espermatozoides resultantes da congelação e descongelação, mantém a osmolaridade e promove o tamponamento dos diluentes (BATEMAN, 2001).

Santos (2003) observou que os crioprotetores tais como o glicerol, o etilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO), também exercem efeitos tóxicos sobre os espermatozoides, porém, esses efeitos são dependentes da concentração utilizada e do período de exposição das células

ao agente. A gema de ovo é bastante utilizada como agente crioprotetor não permeável nos diluidores de criopreservação, no entanto, apesar de agir na proteção espermática contra o choque frio (MOUSSA et al., 2002), sua comercialização no mercado internacional é bastante comprometida. Atualmente, o meio crioprotetor comercial CaniPlus Freeze[®] (à base de TRIS), acrescido de 20% de gema de ovo, tem sido utilizado e também tem proporcionado resultados adequados na criopreservação de sêmen canino (DORADO et al., 2011).

A I.A. com sêmen fresco ou refrigerado tem sido utilizada com resultados satisfatórios (LINDE-FORSBERG e FORSBERG, 1993), no entanto, os resultados com sêmen congelado, ainda são bastante heterogêneos (SILVA, 1998; SANTOS, 2004, KIM et al., 2007). A maioria dos autores tem obtido melhores resultados utilizando I.A. intrauterina (mediante laparotomia, laparoscopia ou cateterismo cervical) com os índices de gestação variando de 60 a 90% (TSUTSUI et al., 2000; LINDE-FORSBERG, 2002), o que pode ser explicado pela utilização de diferentes meios diluentes, métodos de congelação, descongelação e envase utilizados.

2.3 Centrifugação coloidal de sêmen

A centrifugação de sêmen diluído, através de uma coluna de sílica revestida com o coloide de glicidoxipropiltrimetoxissilano, é uma metodologia atual, espécie –específica (MORRELL et al., 2014). Esta técnica proporciona a separação dos espermatozoides vivos do plasma seminal, selecionando também subpopulações de espermatozoides que apresentam alta motilidade, morfologia normal, membranas íntegras e integridade da cromatina do restante do ejaculado (MORRELL et al., 2010a), removendo inclusive possíveis patógenos (WALLGREN et al., 2010; MORRELL et al., 2016).

Essa metodologia de seleção foi desenvolvida pela *Swedish University of Agricultural Sciences (SLU)* e inicialmente, desenvolvida para uso em equinos, porém, atualmente tem sido utilizado com êxito em diferentes espécies (MORRELL et al., 2008b, GUTIÉRREZ-CEPEDA et al., 2011, MARTINEZ-ALBORCIA et al., 2012, DORADO et al., 2013). Sua aplicabilidade faz-se tanto na criopreservação seminal, pois seleciona espermatozoides que não toleram o resfriamento até 4-6 °C, como também em técnicas mais laboriosas, tais como injeção espermática intracitoplasmática (ICSI) e fertilização *in vitro* (MORRELL et al., 2009; THYS et al., 2009; MARI et al., 2010; MORRELL et al., 2010b).

Em equinos, Morrell et al. (2010c) relatam que espermatozoides selecionados via centrifugação em simples camada, também tiveram aumento na motilidade progressiva após descongelamento, o que poderia auxiliar em maiores taxas de gestação após I.A. Hoogewijs et al. (2011) confirmaram essa hipótese ao utilizar centrifugação em simples camada com sílica coloidal antes da congelamento, obtendo rendimento inferior, com menor taxa de recuperação espermática após a centrifugação, quando comparado com o grupo de controle ($50,9 \pm 14,2\%$ versus $97,1 \pm 9,0\%$, respectivamente), calculando-se a taxa de recuperação espermática a partir dos valores da concentração espermática obtidos antes e após a centrifugação, destacando que houve melhora na qualidade do sêmen descongelado de garanhões, assim como acontece com varões (MARTINEZ et al., 2012).

Recentemente, Morrel et al. (2016), afirmaram que a taxa de recuperação espermática na centrifugação coloidal está ligada à qualidade da amostra original do sêmen variando de 20 a 90%, com recuperação média $>50\%$, entretanto, resultados inferiores foram encontrados por Chatdarong et al. (2010), em estudo com centrifugação coloidal com Androcoll-F®, de sêmen descongelado de gatos, com taxa de recuperação espermática que variou entre $10,7 \pm 8,9\%$ e $16,4 \pm 8,7\%$. Poucos são os estudos realizados utilizando a sílica coloidal no sêmen canino, entre eles destaca-se os as pesquisas realizadas por Morrell et al., (2009) e Dorado et al., (2013), aplicando essa metodologia após descongelamento e avaliando os parâmetros espermáticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

-Verificar a influência da centrifugação utilizando a sílica coloidal equina na seleção qualitativa e quantitativa de espermatozoides caninos no processo de congelamento.

3.2 Objetivos específicos

-Verificar a influência da centrifugação pré e/ou pós congelamento com sílica coloidal equina nos parâmetros espermáticos microscópicos do sêmen canino (concentração, motilidade e vigor).

- Avaliar a influência da centrifugação pré e/ou pós congelação com sílica coloidal equina em realizar a seleção de espermatozoides caninos morfologicamente íntegros.

4 HIPÓTESE

A centrifugação com sílica coloidal equina melhora os parâmetros seminais microscópicos do sêmen canino congelado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; SAID, T. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction Update**, UK, v.9, n.4, p.331-345, July 2003.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. New York: Garland Science, 2008. 1268 p.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, Califórnia, v.7, n.3, p. 145-173, 1987.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.
- BATEMAN, H.L. **Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival**. 2001. 50f. Tese (Mestrado) - University of Guelph, 2001.
- BEDFORD, J.M.; HOSKINS, D.D. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. In: Lamming, G. E. **Marshall's physiology of reproduction**. London: Churchill Livingstone, 1990. v.2, p. 379-568.
- BERTOZZO, B. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Efeito da adição do colesterol ao meio de incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas plasmáticas e acrossomal. Disponível em: <<http://www.propp.ufms.br>> Acesso em: 04 out. 2017.
- BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, Copenhagen, v.25, n.7, p.383-391, 1973.
- BRANDÃO, A. C. et al. Influência do glicerol e etilenoglicol e da criopreservação sobre o complexo DNA-proteína de espermatozoides em garanhões. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, supl., p. 68-73, 2006.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R; UCHOA, D.C. et al. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v.59, n.3-4, p.743-751, Feb. 2003.
- CARDOSO, R. C. S. et al. Andrologia e criopreservação de sêmen em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.4, p.167-179, out./dez. 2016.

CELEGHINI, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre a membrana 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.

CHATDARONG, K., THUWANUT, P., MORRELL, J.M. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. **Theriogenology**, v.73, n.9, p. 1284–1292, June 2010.

CHIRINÉA V. H. et al. Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de congelação de sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.3, p.361-363, 2003.

CHRISTIANSEN, I. J. Reprodução no cão e no gato. São Paulo: Manole, 1988. 363p.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, MG, 2013. 104p.

DERIVAUX, J. Reprodução dos animais domésticos. Zaragoza: Acribia, 1980. 446p.

DORADO, J. et al. Identification of sperm subpopulations in canine ejaculates: effects of cold storage and egg yolk concentration. **Animal Reproduction Science**, USA, v.127, n.1-2, p.106–113, Aug. 2011.

DORADO J. et al. Use of single-layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. **Theriogenology**, USA, v.80, n.8, p. 955-962, Nov. 2013.

FELDMAN, E.D.; NELSON, R.W. Canine and feline endocrinology and reproduction. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. 778p.

FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochim Biophys Acta**, USA, v.1469, n.3, p.197-235, Nov. 2000.

GARCIA-HERREROS, M. et al. Standardization of samples preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, UK, v.29, n.5, p.553-563, Apr. 2006.

GUTIÉRREZ-CEPEDA, L. et al. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. **Animal Reproduction Science**, USA, v.124, n.1-2, p. 85–89, Mar. 2011.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, USA, v. 62, n.1-3, p. 03-22, Aug. 2000.

HOOGEWIJS, M. et al. Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. **Equine Veterinary Journal**, UK, v. 43, n.40, p. 35-41, Nov. 2011.

HORI, T. et al. Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. **Journal of Veterinary Medical Science**, Japan, v. 68, n. 10, p. 1055-1061, oct. 2006.

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J. Validation of sperm quality analyzer (SQA) for dog semen analysis. **Theriogenology**, USA, v.55, n.5, p.1143-1158, mar. 2001.

IVANOVA-KICHEVA, M.G. et al. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, USA, v.48, n.8, p.1343- 1349, dec. 1997.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEM, H.H.; ZANEVELD, L.J.D. The hipoosmotic swelling test: an update. **Archive of Andrology**, England, v.29, n.2, p.105-116, sept./oct.1992.

JOHNSON C. Conceitos atuais sobre infertilidade no cão. **Waltham Focus**, UK, v.16, n.2, p.7-12, june 2006.

JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OSLON,P.N.S. Semencollection, evaluation and preservation. In: ____. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders. 2001. cap.16. p. 287-306.

KIM, H.J. et al. Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-thawed canine semen. **Journal of Veterinary Science**, Korea, v.8, n.1, p.75-80, mar. 2007.

KRUSTRITZ MV. **Clinical canine and feline reproduction**: evidence based answers. Iowa, EUA: Offece. 2010. p.25-27; 29-33.

KUTZLER, M. A. Semen collection in the dog. **Theriogenology**, USA, v. 64, n.3, p. 747-754, aug. 2005.

LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, England, v.47, n.1, p.313-323, jan. 1993.

LINDE-FORSBERG, C. **Intra-uterine insemination in the dog using scandinavian transcervical catheter and a comparison with other methods**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2002.

MARI G. et al. Stallion spermatozoa prepared by single layer centrifugation with androcoll TM-E are capable of fertilization in vivo. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45,supl. 3, p.97, 2010.

MARTINEZ-ALBORCIA, M. J.et al. Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior freezing. **Theriogenology**, USA, v. 78, n.5, p. 1117–1125, sept. 2012.

MOCÉ E, GRAHAM JK. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, USA, v.105, n.1-2, p.104-118, apr. 2008.

MORAES, E. A. et al. Delivering cholesterol of cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, USA, v.118, n.2-4, p.148–154, apr. 2010.

MORRELL, J.M, DALIN, A.M. , RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. **Animal Reproduction**, Brazil, v. 5, n.3/4, p. 121–126, jul/dec. 2008a.

MORRELL, J.M, RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LINDE FORSBERG,C. Single layer centrifugation on a colloid selects motile and morphologically normal spermatozoa from dog semen: preliminary results. **Reproduction in Domestic Animals**, USA, v. 43, n. 61, p. 29, nov. 2008b.

MORRELL, J.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ,H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. **The Open Andrology Journal**, United Arab Emirates, v.1, n.1, p. 1-9, dec. 2009.

MORRELL, J.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., JOHANNISSON, A. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. **Equine Veterinary Journal**, UK, v.42, n.7, p.579–85, oct. 2010a.

MORRELL, J. M. et al. Stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation with Androcoll™-E have normal functionality after ICSI. **Animal Reproduction Science**, USA, v.121, n.1-2, p. 196–197, may. 2010b.

MORRELL,J.M., H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., JOHANNISSON, A. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing. **Reproductive Biomedicine**, UK, v. 21, n.3, p.429– 436, sept. 2010c.

MORRELL,J. M. et al. Single-layer centrifugation separates spermatozoa from diploid cells in epididymal samples from gray wolves, *Canis lupus*. **Theriogenology**, USA, v. 82, n. 5,p. 773-776, sept. 2014.

MORRELL, J. M. et al. Practical applications of sperm selection techniques for improving reproductive efficiency. **Animal Reproduction**, Brazil, v.13, n.3, p. 340-345, jul./sept. 2016.

MORTIMER, S.T. Casa- practical aspects. **Journal of Andrology**, USA, v.21, n.4 , p.515-524, july/aug. 2000.

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

OHASHI, O. M. Inseminação artificial de bubalinos. In: GONSALVES, P. B.; FIQUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p. 97-110.

OETTLÉ, E.E.; SOLEY, J.T. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. **Veterinary Medical Review**, South Africa, v.59, n.1,p. 28-70, jan. 1988.

OETTLÉ, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford-UK, v.47, n.1, p.257-260, june 1993.

PAPA, F.O. et al. Coloração espermática segundo karras modificado pelo emprego do barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.115-23, june 1988

PARKS, J. E. Hypothermia and Mammalian gametes. In: KAROW, A. M.; CRITSER, J. K. (Eds.) **Reproduction tissue banking: scientific principles**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 229-261.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with percoll. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 1-30, july 2000.

PESCH, S.; HOFFMANN, B. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. **Journal fur Reproductions Medizin Endokrinologie**, Germany, v.2, n.4,p. 101-105, May. 2007.

QUINTELA A.T. et al. Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. **Animal Reproduction**, Brazil, v.7, n.2, p.70-74, jan. 2010.

RIJSSELAERE, T. et al. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, USA, v.57, n.6, p. 1669-1681, apr. 2002.

RIJSSELAERE, T. et al. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, USA, v.60, n.8, p.1553-1568, nov. 2003.

ROOT, M.V.; JOHNSTON, S. D. Basics for complete reproductive examination of the male dog. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, USA, v.9, n.1, p.41-45, Feb. 1994.

ROTA, A. et al. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. **Theriogenology**, USA, v.65, n.9, p.1848-1858, nov. 2005.

SANTOS, I.W. Albumina sérica bovina como fonte proteica do diluidor tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino. 2004. 63f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SANTOS, O. E. C. Viabilidade in vitro do sêmen de cão submetido a congelação com diferentes diluidores e crioprotetores. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

SEAGER, S.W.J., FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Laboratory Animal Science**, USA, v.22, n.2, p.177-182, june 1972.

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

SILVA, A. R. et al. Efeito das etapas do processamento de criopreservação sobre a qualidade do sêmen canino diluído em tris. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.25, n.1, p.474-474, jun. 2001.

SILVA, A. R. et al. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, USA, v.59, n. 3-4, p. 821-829, Feb. 2003.

SILVA, A. R. et al. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. **Theriogenology**, USA, v.66, n.2, p.456-462, july 2006.

SILVA, L.D.M.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R. Efeito do processo de descongelação sobre a viabilidade do sêmen canino in vitro. **Ciência Animal**, Santa Maria, RS, v.8, n.2, p.75-80, jun. 1998.

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação artificial em cães: biotécnicas aplicadas a reprodução animal. São Paulo: Editora Varela, 2002.

SIQUEIRA, J. B. Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com teste de avaliação espermática in vitro. 2004. 91f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

STORNELLI, M. C. et al. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, Buenos Aires, v.25, n.2, p.28-35, jun. 2005.

THOMASSEN, R. et al. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. **Theriogenology**, USA, v.66, n.6-7, p.1645-1650, oct. 2006.

THYS, M. et al. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer (Glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane coated silica colloidal centrifugation. **Reproduction in Domestic Animals**, USA, v.44, n.3, p.390-394, june. 2009.

TSUTSUI, T. et al. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk Tris- fructose citrate. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Japan, v.62, n.1, p.603-606, june 2000.

VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M. Membrana plasmática do espermatozoide. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.1, n. 36, p. 45-53, jun. 2001.

VANNUCCHI, C. I; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães. **Clinica Veterinária**, São Paulo, v.3, n. 15, p. 22-26, jul./ago. 1998.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, USA, v.57, n.1, p.149-179, jan. 2002.

WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MORRELL, J.M. Single layer centrifugation with Androcoll™-P removes, or substantially reduces, bacterial contamination in boar sperm samples. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SPERMATOLOGY, 11., 2010, Okinawa, Japan, **Proceedings...** Okinawa, Japan, 2010.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, USA, v. 60-61, n.2, p.481-492, july 2000.

CAPÍTULO 2

Cinética e recuperação espermática do sêmen canino centrifugado com sílica coloidal equina durante o processo de congelação

[Kinetics and sperm retrieval of canine semen centrifuged with equine colloidal silica during the freezing process]

A.M. Rosa¹, H.P. Darcádia¹, T. Saito¹, M.M. Gioso², P.I.S. Amaral¹, A.A.P. Derussi¹

¹Universidade José Rosário Vellano-Unifenas

²Universidade Cruzeiro do Sul

RESUMO

A utilização do sêmen canino congelado facilita o manejo na reprodução canina e preserva material genético de alto valor zootécnico e/ou afetivo, no entanto, são insatisfatórios os índices de concepção e nascimentos obtidos com seu uso, demonstrando que o aprimoramento desta biotécnica é necessário. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da centrifugação com camada única de sílica coloidal de glicidoxipropiltrimetoxissilano – fórmula equina – Androcoll-E®(Minitube,Germany), antes e após a congelação do sêmen canino. Para tal, foram testados quatro protocolos de centrifugação na técnica de congelação seminal: protocolo AA (usando Androcoll-E na pré e pós descongelação), protocolo AE (usando Androcoll-E na pré congelação e CaniPlus Enhance na pós descongelação), protocolo EA (usando CaniPlus Enhance na pré congelação e Androcoll-E na pós descongelação) e protocolo EE (usando CaniPlus Enhance na pré e pós descongelação). A taxa de recuperação e a cinética espermática subjetiva e computadorizada foram analisadas. Teste de variância, Tukey e Kruskal Wallis foram usados para avaliação dos resultados, considerando significativo $p < 0,05$. Os protocolos utilizados diferiram somente com relação aos parâmetros referentes a: velocidade média da trajetória e curvilínea (superiores no grupo EE), batimento flagelar cruzado e retilinearidade (superiores no grupo EA) e a linearidade (superior no grupo AA). O uso da centrifugação com sílica coloidal equina após descongelação (grupo EA) seleciona espermatozoides morfolologicamente íntegros, que apresentam parâmetros que indicam melhor capacidade de migração e penetração no muco cervical.

Palavras-chave: Cão. Criopreservação. Glicidoxipropiltrimetoxissilano.

ABSTRACT

The use of frozen canine semen improves the handling in canine reproduction and preserves genetic material of high zootechnical and / or affective value, however, the conception and birth rates obtained with its use are unsatisfactory, demonstrating that the improvement of this biotechnology is necessary. Thus, the objective of this study was to evaluate the influence of the single layer centrifugation using colloidal silica colloidal glycidoxypropyltrimethoxysilane-Androcoll-E® (Minitube, Germany) - equine formula – before and after the freezing of canine semen. For this purpose, four protocols of centrifugation were tested in the seminal freezing technique: AA protocol (using Androcoll-E in pre- and post-thawing), AE protocol (using Androcoll-E in pre-freezing and CaniPlus Enhance after thawing), EA protocol using CaniPlus Enhance in pre-freezing and Androcoll-E in post-thawing) and EE protocol (using CaniPlus Enhance in pre- and post-thawing). Recovery rate and subjective and computed spermatic kinetics were analyzed. Test of variance, Tukey and Kruskal Wallis were used to evaluate the results, considering $p < 0.05$. The protocols used differed only in relation to the mean velocity of the trajectory and curvilinear (superior in the EE group), cross flagellar beating and rectilinearity (superior in the EA group) and linearity (superior in the AA group). The use of equine colloidal silica centrifugation after thawing (EA group) selects morphologically intact spermatozoa, which present parameters that indicate a better migration capacity and penetration into the cervical mucus.

Keywords: Dog. Cryopreservation. Glycidoxypropyltrimethoxysilane.

INTRODUÇÃO

A relação de afetividade entre humanos e cães é vista como reflexo do processo de modernização das cidades e da individualização, logo, é esperado que haja o crescente aumento no número de canis, de produtos e de serviços destinados a esse segmento que tem mostrado um alto potencial lucrativo dentro do cenário nacional.

A importância da espécie canina igualmente ocorre na área da pesquisa científica, pois é vista como um excelente modelo experimental para estudos destinados à preservação de canídeos selvagens ameaçados de extinção (Silva et al., 2001). Deste modo, a exigência de serviços especializados e o aperfeiçoamento das biotécnicas reprodutivas existentes são constantemente requeridos, a fim de se realizar uma acurada seleção e preservação de material genético de cães de alto valor zootécnico e/ou afetivo.

Dentre as diferentes biotécnicas reprodutivas, tem-se destacado a criopreservação de sêmen, possibilitando diversas vantagens, tais como o melhor aproveitamento do sêmen coletado através de seu fracionamento, a manutenção da capacidade fecundante por um período indeterminado de tempo, a diminuição do estresse causado pelo transporte do animal e a facilitação da propagação do material genético para diferentes regiões (Linde-Forsberg e Forsberg, 1993; Silva et al., 2001), no entanto, apesar de todas essas aplicabilidades, a utilização do sêmen canino congelado no Brasil, praticamente restringe-se a laboratórios de pesquisa, principalmente devido à sua baixa taxa de concepção, fato que é atribuído tanto ao processo da manipulação seminal, como também às injúrias causadas ao sêmen na congelação, diminuindo assim, sua viabilidade espermática pós-descongelação.

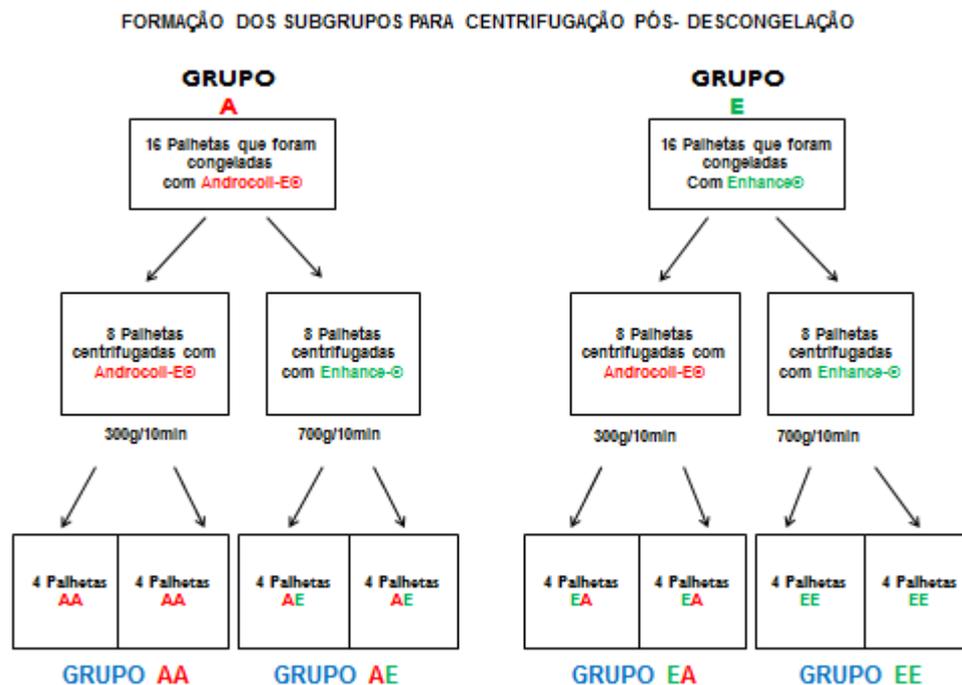
Para amenizar tais injúrias, provocadas pela ação dos crioprotetores, tem sido estudada a utilização de coloides em uma única camada para a centrifugação de sêmen, com o intuito de melhorar a viabilidade de células espermáticas pré e pós-descongelação, obtendo melhorias nos padrões de qualidade espermática (Dorado et al., 2013), no entanto, poucos estudos foram realizados utilizando esta metodologia na espécie canina. A técnica baseia-se na centrifugação de sêmen diluído através de uma camada única de sílica revestida com um coloide de glicidoxipropiltrimetoxissilano(Androcoll®), havendo, assim, a separação dos espermatozoides do plasma seminal, possibilitando a seleção dos espermatozoides que são móveis, viáveis e com boa integridade de cromatina(Pertoft, 2000). O uso da sílica coloidal espécie-específica (Androcoll-C®), foi iniciado por Morrell (2009), porém, esta não é disponibilizada no mercado brasileiro, o que torna a sílica coloidal equina (Androcoll-E®) uma alternativa plausível para se

atingir o objetivo de realização de um processo de seleção qualiquantitativa de espermatozoides caninos morfológicamente íntegros.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados cinco cães, de raças distintas, sadios, com idade entre 3 a 6 anos, que possuíam condições de manejo e alimentação similares, e características seminais de acordo com os parâmetros estipulados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Todos os procedimentos do experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética (CEUA) da Universidade José do rosário Vellano - UNIFENAS-Alfenas sob o número 49/2015. Cada macho utilizado foi submetido a 7 coletas realizadas através da manipulação digital do bulbo, duas vezes por semana, com intervalo mínimo de 72 horas, sendo somente a segunda fração espermática coletada. Imediatamente após esta, a avaliação macroscópica do sêmen foi realizada. Na avaliação macroscópica foram observados volume (mensurado através da graduação do tubo utilizado na coleta), odor (inalação da amostra, considerado normal quando *sui generis*) e cor (visualização direta da coloração da amostra) Após a determinação dos parâmetros seminais macroscópicos procedeu-se a etapa de centrifugação e congelamento do sêmen. A amostra seminal de cada animal foi subdividida em duas partes idênticas, e para cada uma das partes foi utilizado duas diferentes metodologias de centrifugação. Naquelas em que foi adicionada a sílica coloidal, o processo foi realizado lentamente com uma inclinação de 45° e a amostra centrifugada a 300g, por 10 minutos, seguindo a recomendação do fabricante. Nas que foram utilizadas o meio CaniPlus Enhance® na centrifugação, a adição do meio foi lenta e realizada sobre o sêmen, percorrendo a lateral do tubo, e após isso centrifugada a 700g, por 10 minutos, também de acordo com a recomendação do fabricante. Ambas as soluções foram previamente aquecidas em banho-maria, a 37°C, e preparadas na proporção de 1 mL da solução escolhida para cada 100×10^6 espermatozoides. Sendo assim, formaram-se os grupos, conforme figura 1.

Figura 1:



-GRUPO A: amostras seminais que passaram por centrifugação pré congelamento utilizando a sílica coloidal -Androcoll-E®-(Minitube, Germany).

-GRUPO E: amostras seminais que passaram por centrifugação pré congelamento utilizando o meio CaniPlus Enhance®- (Minitube; Germany).

Após essa etapa de centrifugação em ambos os grupos, o sobrenadante foi dispensado e o sêmen ressuspendido em meio de congelamento comercial CaniPlus Enhance®, na mesma proporção. As alíquotas de ambos os grupos (A e E) foram diluídas no meio comercial CaniPlus Freeze® (Minitube; Germany), acrescido de 20% de gema de ovo de galinha. A concentração final para envase foi de 25×10^6 espermatozoides móveis/palhetas de 0,25 mL, sendo que um total de 16 palhetas/animal/grupo foram envasadas à temperatura ambiente e posteriormente levadas ao refrigerador à temperatura 2 a 6°C, onde permaneceram por duas horas. Após essa etapa de refrigeração, o sêmen foi levado a cinco centímetros acima do vapor do nitrogênio, durante 20 minutos, quando finalmente foi colocado em contato com o nitrogênio líquido, a -196°C, seguindo a metodologia proposta por Andersen (1975) com modificações baseadas em Rota et al. (2005) e Thomassen et al. (2006).Após 7 dias, todas as palhetas dos Grupos A e E foram descongeladas em banho-maria,a 37°C, por 60 segundos, seguindo metodologia proposta por Silva et al. (1998) e foram utilizadas para a formação dos 4 subgrupos descritos abaixo:

-AA: amostras seminais centrifugadas com sílica coloidal equina antes da congelamento e centrifugadas com sílica coloidal equina após a descongelamento

-AE: amostras seminais centrifugadas com sílica coloidal equina antes da congelação e centrifugadas com CaniPlus Enhance® após a descongelação

-EA: amostras seminais centrifugadas com CaniPlus Enhance® antes da congelação e centrifugadas com sílica coloidal equina após a descongelação

-EE: amostras seminais centrifugadas com CaniPlus Enhance® antes da congelação e centrifugadas com CaniPlus Enhance® após a descongelação

Quatro palhetas/animal foram utilizadas para formação de um pool e 10 pools formaram cada subgrupo. Ao final da centrifugação após descongelação, os quatro subgrupos (AA, AE, EA, e EE) foram novamente analisados com relação aos parâmetros microscópicos anteriormente citados (motilidade subjetiva, vigor e concentração espermática) e nesse momento realizou-se também a análise da recuperação e a avaliação da cinética espermática computadorizada. Para a avaliação da recuperação espermática, foi determinada a concentração espermática ao final do procedimento em cada subgrupo e a porcentagem de espermatozoides recuperados baseando-se no envase pré-definido de 25×10^6 espermatozoides /mL em cada palheta utilizada. Na análise microscópica subjetiva, a amostra seminal foi observada em microscópio óptico, em lâmina aquecida a 37°C, a fim de se avaliar a motilidade espermática, através da observação da porcentagem de espermatozoides móveis (escala de 0 a 100%) segundo Kenney (1983) e vigor (escala de 0 a 5) segundo Johnston et al., (2001). Para a determinação da concentração espermática utilizou-se a diluição de (1:100) em solução formol salina e a contagem em câmara de Neubauer (CBRA, 2013). A avaliação da cinética espermática foi realizada utilizando o sistema de análise computadorizada (CASA- Hamilton Thorn Motility Analyzer – HTMA – IVOS 12, USA) e um quadrante da câmara foi escolhido pelo examinador, enquanto outros dois foram escolhidos aleatoriamente pelo equipamento e em seguida analisados. Os parâmetros relacionados a motilidade total, progressiva, velocidade de trajetória (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento da cauda (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) foram avaliados. Os dados obtidos foram previamente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis relativas à motilidade computadorizada que obedeceram aos preceitos para a análise de variância foram submetidas à ANOVA, em delineamento inteiramente casualizado, tendo os protocolos experimentais como efeito fixo e os cães como efeito aleatório. As médias foram então comparadas pelo teste de Tukey com 95% de

significância. Os parâmetros de concentração espermática, motilidade subjetiva e vigor espermático foram comparados por meio do teste não paramétrico de medianas de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade seminal após descongelamento obtida em todos os 4 protocolos propostos foi satisfatória às exigências do CBRA (2013). Não houve diferença em relação à recuperação espermática, motilidade subjetiva e vigor entre os protocolos utilizados, conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Valores para as medianas (intervalo interquartil) referentes à concentração espermática, a motilidade subjetiva e ao vigor espermático de doses de sêmen canino preparadas com ou sem o uso de Androcoll-E[®] no processo de centrifugação.

Protocolos ¹	Concentração espermática (espermatozoides/mL) ²	Motilidade subjetiva (%) ²	Vigor espermático (0-5) ²
AA	15,0(17,50)	70,0(10,0)	3,0(2,00)
AE	20,0(17,50)	70,0(0,0)	3,0(0,25)
EA	10,0(11,25)	80,0(20,0)	3,0(2,00)
EE	17,5(12,50)	70,0(12,5)	3,0(0,50)
P-valor	0,283	0,754	0,929

¹AA: Centrifugação com Androcoll-E[®] antes e após o congelamento; AE: Centrifugação com Androcoll-E[®] somente antes do congelamento; EA: Centrifugação com Androcoll-E[®] somente após do congelamento; AA: Centrifugação sem Androcoll-E[®] antes e após o congelamento.

²Medianas comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Dorado et al. (2013) e Morrel et al. (2008), ao utilizarem a sílica específica para a espécie canina- Androcoll-C[®]- , afirmam que a mesma proporciona melhorias evidentes na qualidade seminal para os procedimentos de inseminação artificial, pois obtiveram valores superiores em relação a motilidade e vigor após seu uso, tanto em sêmen fresco como congelado. Neste estudo, foi obtido nível satisfatório de qualidade seminal do sêmen canino utilizando-se a sílica coloidal destinada à espécie equina, porém os parâmetros de cinética espermática não foram aumentados em nenhum dos subgrupos avaliados.

O processo de centrifugação simples pode causar danos estruturais no acrossoma e na membrana plasmática do espermatozoide, o que pode gerar, inclusive, uma considerável redução na motilidade espermática (Rijsselaere et al., 2002). Santos(2003),

em procedimentos de centrifugações duplas (pré e pós descongelamento), demonstrou resultados superiores em relação a motilidade e vigor, quando comparadas aos procedimentos de criopreservação que incluem somente centrifugação pré descongelamento, sendo importante ressaltar que o tipo de meio diluidor influencia consideravelmente os resultados obtidos.

Em média, cerca de 50% ou mais da concentração de sêmen original é recuperada após o uso da sílica, variando de 20 a 90% (Morrell et al., 2016). No presente estudo, centrifugando-se 100×10^6 espermatozoides/mL, em sílica coloidal equina, as taxas de recuperação espermática variaram de 11 a 18,5%, resultado semelhante aos obtido por Chatdarong et al. (2010), quando utilizada essa metodologia com sílica específica em gatos (média de 10,7% a 16,4%). Alterações na taxa de recuperação espermática são esperadas já que o uso da sílica tem por função remover de espermatozoides danificados (Morrell, 2010).

Na análise computadorizada realizada pelo sistema CASA, diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) os parâmetros relacionados a VCL, VSL, VAP, LIN STR e BCF conforme demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores referentes à análise computadorizada da motilidade de doses de sêmen canino preparadas com ou sem o uso de Androcoll-E[®] no processo de centrifugação, sendo VCL (velocidade curvilínea), VSL (velocidade linear progressiva), VAP (velocidade média da trajetória), LIN (linearidade), STR (retilinearidade), WOB (índice de oscilação), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça) e BCF (frequência de batimento flagelar cruzado).

Protocolos ¹	Parâmetros CASA ²							
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WO B (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
AA	34,5B	17,0	21,6A	54,5A	74,1A	69,2	2,8	3,9A
			B		B			B
AE	34,7B	13,5	19,8B	43,7B	64,5C	63,2	2,9	2,8B
EA	39,3A	19,7	25,3A	52,0A	76,9A	67,0	3,0	4,3A
	B		B	B				
EE	46,9A	19,9	27,9A	43,3B	67,3B	61,4	3,5	3,4A
					C			B
CV(%)	28,3	32,08	26,29	18,98	11,75	12,11	24,5	30,03

¹AA: Centrifugação com Androcoll-E[®] antes e após o congelamento; AE: Centrifugação com Androcoll-E[®] somente antes do congelamento; EA: Centrifugação com Androcoll-E[®] somente após do congelamento; AA: Centrifugação sem Androcoll-E[®] antes e após o congelamento.

²Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Em relação à VAP e VCL, o subgrupo EE, no qual não utilizou sílica equina em nenhum processo de centrifugação, foi o que apresentou os melhores resultados. Silva et al., (2006) relatam que VSL e VAP são marcos de fertilidade in vitro, pois taxas de fertilização maiores são obtidas quando utilizados sêmen com valores de VAP, VSL e VCL superiores (Verstegen et al.,2002). Em relação a STR e LIN, os subgrupos AA e EA, os quais incluíram o uso da sílica coloidal tanto etapa pré como pós descongelação ou somente na pós descongelação, diferiram estatisticamente dos demais protocolos, apresentando valores superiores. Altos valores de STR estão relacionados com aumento da capacidade fecundante em homens, juntamente com valores superiores de VSL, com valor aumentado significativamente em relação aos demais parâmetros e ALH (Larsen et al., 2000). Parâmetros de velocidade, como LIN e BCF, foram estatisticamente superiores nos grupos AA e EA e foram também correlacionados com melhora migração e penetração no muco cervical (Mortimer, 2000) e, em alguns estudos, têm sido correlacionadas positivamente com aumento da taxa de prenhez, apesar deste fato ainda não ser totalmente elucidado e muitas vezes, contraditório (Verstegen et al., 2002).

CONCLUSÕES

O uso da sílica coloidal equina não resulta em melhora evidente na cinética espermática (motilidade e vigor), principalmente quando utilizada após a descongelação, entretanto, sua utilização, possivelmente, possibilita a seleção de espermatozoides com melhor habilidade de migração e penetração no muco cervical, que pode influenciar na capacidade fertilizante dos mesmos. Sugere-se estudos que analisem a fertilidade in vivo.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*, v.10, p.01-04, 1975.
- CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; MORRELL, J, M. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology*, v.73, p. 1284–1292, 2010.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte, MG, p.104, 2013.
- DORADO J.; GÁLVEZ M. J.; MORRELL J. M. et al. Use of single-layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, v. 80, p. 955-962, 2013.
- JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OSLON, P.N.S. Semen collection, evaluation and preservation. In: _____. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. cap.16. p.287-306.
- KENNEY, R. M.; HURTGEM, J. P.; PIERSON, R. et al. Society for theriogenology manual for clinical fertility evaluation of stallion. Hasting: Society for. *Theriogenology*, 1983. 100p.
- LARSEN,L.;SCHEIKE,T.;JENSEN,T.K.;BONDE,J.P. et.al. The danish first pregnancy planner study team. Computer-assisted semen analysisparameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*,v.15, p. 1562-1567, 2000.
- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Fertily 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.

MORRELL, J.M, RODRIGUEZ-MARTINEZ,H., LINDE FORSBERG,C. Single layer centrifugation on a colloid selects motile and morphologically normal spermatozoa from dog semen: preliminary results. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, n.61, p.29, 2008.

MORRELL, J.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ,H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *The Open Andrology Journal*, v.1, p.1-9, 2009.

MORRELL, J.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., JOHANNISSON, A. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. *Equine Veterinary Journal*, v.42, p.579– 85, 2010.

MORRELL, J. M.; SABESALSINA, M.; ABRAHAM, M. C.; SJUNNESSON,Y. Practical applications of sperm selection techniques for improving reproductive efficiency. *Animal Reproduction*, v.13, n.3, p.340-345, 2016.

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

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*,v. 44, n. 1-2, p. 1–30, 2000.

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

ROTA, A. MILANI, C., CABIANCA, G., MARTINI, M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, v.65, p.1848-1858, 2005.

SANTOS, O. E. C. *Viabilidade in vitro do sêmen de cão submetido a congelação com diferentes diluidores e crioprotetors*. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

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

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

SILVA, L.D.M.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R. Efeito do processo de descongelação sobre a viabilidade do sêmen canino in vitro. *Ciência Animal*, v. 8, n.2, p. 75-80, 1998.

THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENAES, A.; FOUGNER, J. A. et al. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology*, v.66, p.1645-1650, 2006.

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

CAPÍTULO 3

Avaliação de parâmetros seminais caninos na centrifugação com camada única de sílica coloidal equina no processo de congelamento

[Evaluation of canine seminal parameters in single layer centrifugation of equine colloidal silica in the freezing process]

**Amarildo M. Rosa¹, Hugo P. Darcádia¹, Tatiana Saito¹, Marilu M. Gioso²,
Pedro I. S. Amaral¹, Ana A.P. Derussi¹**

¹Universidade José Rosário Vellano- Alfenas-MG-Brasil

²Universidade Cruzeiro do Sul-São Paulo-SP-Brasil

¹Correspondência: amarildovet@gmail.com

RESUMO

A centrifugação seminal utilizando a sílica coloidal é uma metodologia atual, espécie-específica, que visa selecionar subpopulações de espermatozoides que apresentam morfologia, membrana e cromatina íntegras. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia da centrifugação com sílica coloidal equina em selecionar espermatozoides caninos íntegros morfologicamente no processo de congelamento. Para tal foram testados quatro protocolos de centrifugação: protocolo AA (uso de Androcoll-E na pré e pós descongelamento), protocolo AE (Androcoll-E na pré congelamento e CaniPlus Enhance na pós descongelamento), protocolo EA (CaniPlus Enhance na pré congelamento e Androcoll-E na pós descongelamento) e protocolo EE (CaniPlus Enhance na pré e pós descongelamento). Os parâmetros de integridade de membrana e morfologia espermática foram avaliados através de teste hiposmótico e preparação úmida com corante Rosa bengala, respectivamente. Os resultados em relação à morfologia espermática diferiram entre os protocolos testados pelo Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). O protocolo EA foi o que apresentou menor número de defeitos menores (<10%) e maior porcentagem de espermatozoides íntegros (95%) enquanto no grupo AE, os defeitos menores (23%) e maiores (17%) foram superiores aos aceitáveis, evidenciando que o uso da sílica equina após descongelamento foi eficaz na seleção de espermatozoides morfologicamente íntegros.

Palavras-chave: Cão. Criopreservação. Glicidoxipropiltrimetoxissilano.

ABSTRACT

Seminal centrifugation using colloidal silica is a current, species-specific methodology that aims to select subpopulations of spermatozoa that have intact morphology, membrane and chromatin. The objective of this study was to evaluate the efficacy of centrifugation with equine colloidal silica in selecting intact canine spermatozoa morphologically in the freezing process. Four protocols of centrifugation were tested: AA protocol (use of Androcol-E in pre and post-thawing), AE protocol (Androcoll-E in pre-freezing and CaniPlus Enhance after thawing), EA protocol (CaniPlus Enhance in pre-freezing and Androcoll-E after thawing) and EE protocol (CaniPlus Enhance in pre- and post-thawing). The parameters of membrane integrity and sperm morphology were evaluated by hyposmotic test and wet preparation with Rosa bengala stain, respectively. The results regarding the spermatid morphology differed between the protocols tested by the Kruskal Wallis test ($p < 0.05$). The EA protocol presented the lowest number of defects (<10%) and higher percentage of intact spermatozoa (95%) whereas in the AE group, minor defects (23%) and greater (17%) were higher than acceptable, evidencing that the use of equine silica after thawing was effective in the selection of morphologically intact spermatozoa.

Keywords: Cryopreservation. Dog. Glycidoxypropyltrimethoxysilane.

INTRODUÇÃO

A relação de afetividade entre humanos e cães é vista como reflexo do processo de modernização das cidades e da individualização, logo, é esperado que haja o crescente aumento no número de canis, de produtos e de serviços destinados a esse segmento que tem mostrado um alto potencial lucrativo dentro do cenário nacional.

A importância da espécie canina igualmente ocorre na área da pesquisa científica, pois é vista como um excelente modelo experimental para estudos destinados à preservação de canídeos selvagens ameaçados de extinção (Silva et al., 2001). Deste modo, a exigência de serviços especializados e o aperfeiçoamento das biotécnicas reprodutivas existentes são constantemente requeridos, a fim de se realizar uma acurada seleção e preservação de material genético de cães de alto valor zootécnico e/ou afetivo.

Dentre as diferentes biotécnicas reprodutivas, tem-se destacado a criopreservação de sêmen, possibilitando diversas vantagens, tais como o melhor aproveitamento do sêmen coletado através de seu fracionamento, a manutenção da capacidade fecundante por um período indeterminado de tempo, a diminuição do estresse causado pelo transporte do animal e a facilitação da propagação do material genético para diferentes regiões (Linde-Forsberg e Forsberg, 1993; Silva et al., 2001), no entanto, apesar de todas essas aplicabilidades, a utilização do sêmen canino congelado no Brasil, praticamente restringe-se a laboratórios de pesquisa, principalmente devido à sua baixa taxa de concepção, fato que é atribuído tanto ao processo da manipulação seminal, como também às injúrias causadas ao sêmen na congelação, diminuindo assim, sua viabilidade espermática pós-descongelação.

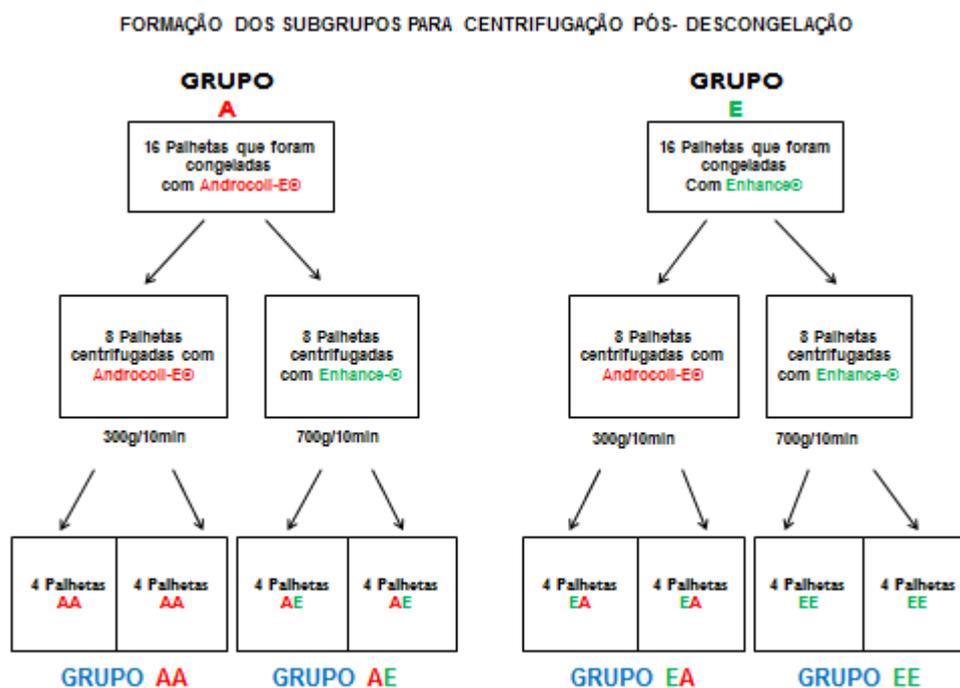
Para amenizar tais injúrias, provocadas pela ação dos crioprotetores, tem sido estudada a utilização de coloides em uma única camada para a centrifugação de sêmen, com o intuito de melhorar a viabilidade de células espermáticas pré e pós-descongelação, obtendo melhorias nos padrões de qualidade espermática (Dorado et al., 2013), no entanto, poucos estudos foram realizados utilizando esta metodologia na espécie canina. A técnica baseia-se na centrifugação de sêmen diluído através de uma camada única de sílica revestida com um coloide de glicidoxipropiltrimetoxissilano(Androcoll®), havendo, assim, a separação dos espermatozoides do plasma seminal, possibilitando a seleção dos espermatozoides que são móveis, viáveis e com boa integridade de cromatina(Pertoft, 2000). O uso da sílica coloidal espécie-específica (Androcoll-C®), foi iniciado por Morrell et al., 2009, porém, esta não é disponibilizada no mercado brasileiro, o que torna a sílica coloidal equina (Androcoll-E®) uma alternativa plausível para se atingir o objetivo de realização de um processo de seleção qualiquantitativa de espermatozoides caninos morfolologicamente íntegros.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados cinco cães, de raças distintas, saudáveis, com idade entre 3 a 6 anos, que possuíam condições de manejo e alimentação similares, e características seminais de acordo com os parâmetros estipulados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Todos os procedimentos do experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética (CEUA) da Universidade José do Rosário Vellano- UNIFENAS-Alfenas sob o número 49/2015. Cada macho utilizado foi submetido a 7 coletas realizadas através da manipulação digital do bulbo, duas vezes por semana, com intervalo mínimo de 72 horas, sendo somente a

segunda fração espermática coletada. Imediatamente após esta, a avaliação macroscópica do sêmen foi realizada. Na avaliação macroscópica foram observados volume (mensurado através da graduação do tubo utilizado na coleta), odor (inalação da amostra, considerado normal quando sui generis) e cor (visualização direta da coloração da amostra) Após a determinação dos parâmetros seminais macroscópicos procedeu-se a etapa de centrifugação e congelamento do sêmen. A amostra seminal de cada animal foi subdividida em duas partes idênticas, e para cada uma das partes foi utilizado duas diferentes metodologias de centrifugação. Naquelas em que foi adicionada a sílica coloidal, o processo foi realizado lentamente com uma inclinação de 45° e a amostra centrifugada a 300g, por 10 minutos, seguindo a recomendação do fabricante. Nas que foram utilizadas o meio CaniPlus Enhance® na centrifugação, a adição do meio foi lenta e realizada sobre o sêmen, percorrendo a lateral do tubo, e após isso centrifugada a 700g, por 10 minutos, também de acordo com a recomendação do fabricante. Ambas as soluções foram previamente aquecidas em banho-maria, a 37°C, e preparadas na proporção de 1 ml da solução escolhida para cada 100×10^6 espermatozoides. Sendo assim, formaram-se os grupos, conforme figura 1.

Figura 1:



-GRUPO A: amostras seminais que passaram por centrifugação pré congelamento utilizando a sílica coloidal -Androcoll-E®-(Minitube, Germany).

-GRUPO E: amostras seminais que passaram por centrifugação pré congelamento utilizando o meio CaniPlus Enhance®- (Minitube; Germany).

Após essa etapa de centrifugação em ambos os grupos, o sobrenadante foi dispensado e o sêmen ressuspendido em meio de congelação comercial CaniPlus Enhance®, na mesma proporção. As alíquotas de ambos os grupos (A e E) foram diluídas no meio comercial CaniPlus Freeze® (Minitube; Germany), acrescido de 20% de gema de ovo de galinha. A concentração final para envase foi de 25×10^6 espermatozoides móveis/palheta de 0,25 ml, sendo que um total de 16 palhetas/animal/grupo foram envasadas à temperatura ambiente e posteriormente levadas ao refrigerador à temperatura 2 a 6°C, onde permaneceram por duas horas. Após essa etapa de refrigeração, o sêmen foi levado a cinco centímetros acima do vapor do nitrogênio, durante 20 minutos, quando finalmente foi colocado em contato com o nitrogênio líquido, a -196°C, seguindo a metodologia proposta por Andersen (1975) com modificações baseadas em Rota et al. (2005) e Thomassen et al. (2006). Após 7 dias, todas as palhetas dos Grupos A e E foram descongeladas em banho-maria, a 37°C, por 60 segundos, seguindo metodologia proposta por Silva et al. (1998) e foram utilizadas para a formação dos 4 subgrupos descritos abaixo:

- AA: amostras seminais centrifugadas com sílica coloidal antes da congelação e centrifugadas com sílica coloidal após a descongelação
- AE: amostras seminais centrifugadas com sílica coloidal antes da congelação e centrifugadas com CaniPlus Enhance® após a descongelação
- EA: amostras seminais centrifugadas com CaniPlus Enhance® antes da congelação e centrifugadas com sílica coloidal após a descongelação
- EE: amostras seminais centrifugadas com CaniPlus Enhance® antes da congelação e centrifugadas com CaniPlus Enhance® após a descongelação

Quatro palhetas/animal foram utilizadas para formação de um *pool* e 10 *pools* formaram cada subgrupo. Ao final da centrifugação após descongelação, os quatro subgrupos (AA, AE, EA, e EE) foram novamente analisados com relação aos parâmetros microscópicos anteriormente citados (análise de morfologia espermática e integridade de membrana)

As análises estatísticas foram procedidas de modo que os dados relativos à integridade de membrana plasmática foram comparados pelo teste não paramétrico de medianas de Kruskal-Wallis. Para as variáveis relativas à patologia espermática, foram confeccionados gráficos boxplot com intervalo de confiança para a mediana (IC=95%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a sílica coloidal equina não foi eficaz na seleção de espermatozoides com maior integridade de membrana, já que não houve diferença entre os protocolos testados em relação a esta variável, conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Valores para as medianas (intervalo interquartil) referentes à integridade de membrana, obtidas na avaliação de doses de sêmen canino preparadas com ou sem o uso de Androcoll-E[®] no processo de centrifugação.

Protocolos ¹	Integridade de membrana plasmática (%) ²
AA	65,0 (10,0)
AE	60,0 (10,0)
EA	70,0 (10,0)
EE	60,0 (10,0)
P-valor	0,176

¹AA: Centrifugação com Androcoll-E[®] antes e após o congelamento; AE: Centrifugação com Androcoll-E[®] somente antes do congelamento; EA: Centrifugação com Androcoll-E[®] somente após do congelamento; AA: Centrifugação sem Androcoll-E[®] antes e após o congelamento.

²Medianas comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Na comparação dos resultados relativos a integridade de membrana, os subgrupos experimentais que utilizaram centrifugação com sílica específica canina (Androcoll-C[®]) somente em um momento (antes ou após descongelação) ou em 2 momentos (antes e após descongelação), os valores obtidos neste experimento não foram significativos. Gálvez et al. (2015) obtiveram espermatozoides com melhor integridade de membrana quando utilizada a centrifugação única antes da congelação (83% versus 78% na centrifugação única após descongelação versus 78% centrifugação dupla), o que pode indicar o efeito deletério da centrifugação excessiva sobre a célula espermática, assim como relatado por Rijsselaere et al. (2002).

Na avaliação da morfologia espermática, baseada na classificação morfológica de Blom (1973) foi constatado que o protocolo EA apresentou menor número de defeitos menores (<10%) e maior porcentagem de espermatozoides normais (95%). Já o grupo AE, tanto a porcentagem de defeitos maiores (17 % de caudas fortemente enrolada) quanto de defeitos menores(23%) foram superiores aos aceitáveis pelo CBRA (2013) e, dentre os defeitos menores existentes, a maior porcentagem encontrada foi em relação a cabeças e caudas livres e caudas enroladas, conforme observado na figura 2 .

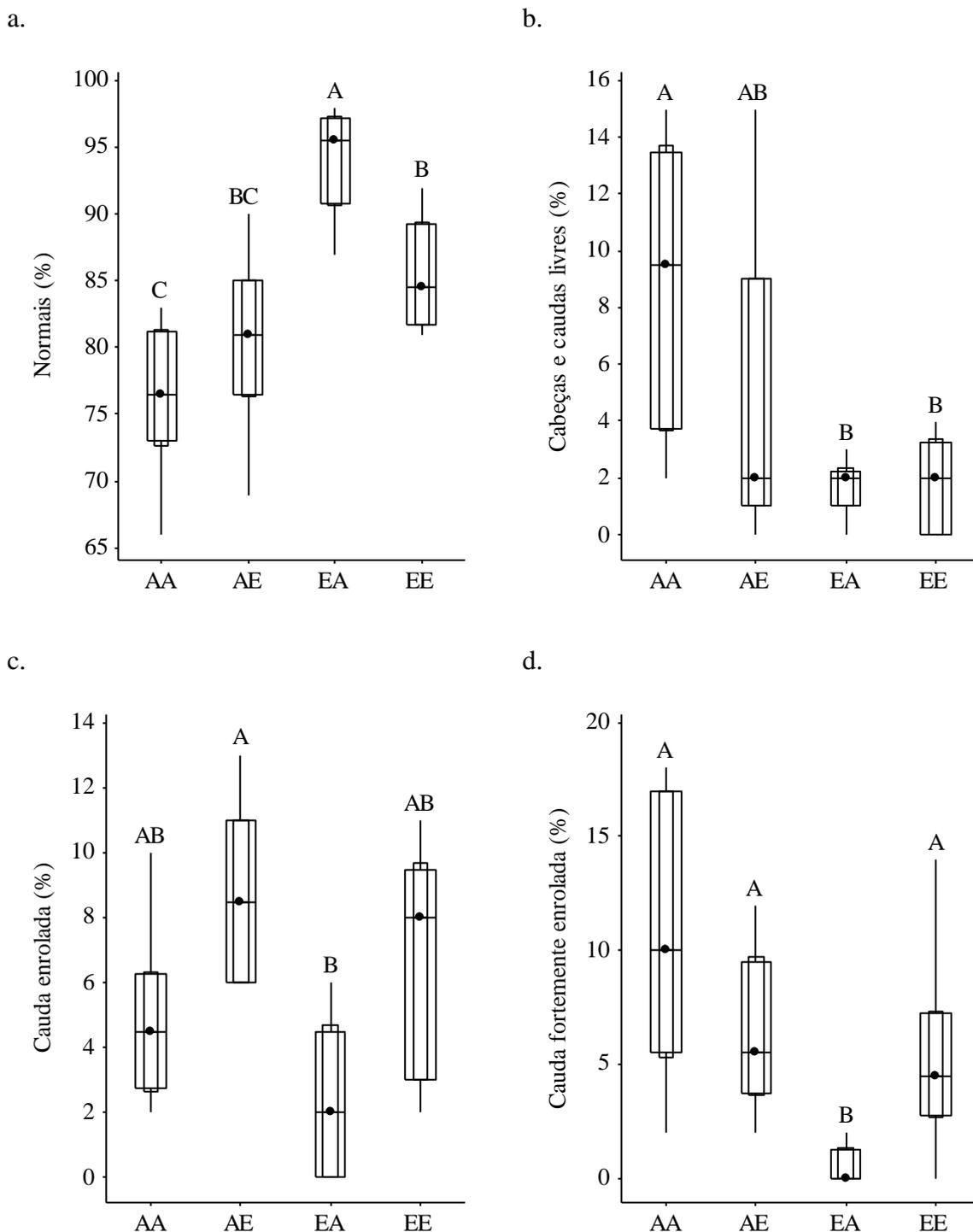


Figura 2. Comparação entre os intervalos de confiança para as medianas (IC=95%) dos protocolos experimentais (AA: Centrifugação com Androcoll-E® antes e após o congelamento; AE: Centrifugação com Androcoll-E® somente antes do congelamento; EA: Centrifugação com Androcoll-E® somente após do congelamento; EE: Centrifugação sem Androcoll-E® antes e após o congelamento) referentes à porcentagem de espermatozoides normais (a), com cabeça e cauda livres (b), com cauda enrolada (c) e cauda fortemente enrolada (d).

A presença da cabeça isolada normal pode ocorrer por ligações mais frágeis entre a inserção da peça intermediária e o colo, a qual no início da motilidade se desprende, resultando na presença de cabeças e caudas livres no ejaculado (Barth e Oko, 1989). Por outro lado, as alterações referentes a patologias de cauda ocorrem mais comumente durante a maturação espermática, no trânsito pelo epidídimo, onde as caudas se dobras depois de formadas, por alguma alteração, que pode ser por choque osmótico (Arruda et al, 2015).

Na comparação dos resultados deste experimento com demais estudos que utilizaram sílica específica canina (Androcoll-C®) e metodologia de centrifugação dupla, os valores obtidos em relação a porcentagem de espermatozoides normais, foram superiores (variando de 74-95%) aos observados por Dorado et al.,(2013) e Gálvez et al.,(2015), nos quais foram obtidos 71,53% e 68% respectivamente.

CONCLUSÕES

A centrifugação com sílica coloidal equina após a descongelação (protocolo EA) é eficaz em selecionar espermatozoides morfologicamente íntegros.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN , K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*, v.10, p. 1–4, 1975.
- ARRUDA, R.P. et. al. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.39, n.1, p.47-60, 2015.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press,1989. 285p.
- BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for anew classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinaer Medicin*, v.25, p.383-391, 1973.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte, MG, p.104, 2013.
- DORADO J.; GÁLVEZ M. J.; MORRELL J. M.; ALCARÁZ L. et al. Use of single-layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, v. 80, p. 955-962, 2013.
- GÁLVEZ, M.J.; ORTIZ, I.; HIDALGO, M.; MORRELL, J.M. et al. Should single layer centrifugation of dog semen be done before or after the semen is cooled? *Veterinary Record*, v.176, 2015.
- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Fertily 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, 1993.
- MORRELL, J.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ,H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *The Open Andrology Journal*, v.1, p. 1-9, 2009.
- PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with percoll. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 44, n. 1-2, p. 1–30, 2000.
- RIJSSELAERE, T. et al. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 57, p.1669-1681, 2002.
- ROTA, A. et al. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, v.65, p.1848-1858, 2005.
- SILVA, A.R. et al. Efeito das etapas do processamento de criopreservação sobre a qualidade do sêmen canino diluído em Tris. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, p.474-474, 2001.

SILVA, L.D.M.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R. Efeito do processo de descongelamento sobre a viabilidade do sêmen canino in vitro. *Ciência Animal*, v.8, n.2, p.75-80, 1998.

THOMASSEN, R. et al. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology*, v.66, p.1645-1650, 2006.