

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO –UNIFENAS

HUGO PIEVE DARCÁDIA

UTILIZAÇÃO DE SÍLICA COLOIDAL COMO MÉTODO DE AUXÍLIO NA
SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CANINO

Alfenas – Minas Gerais

2017

HUGO PIEVE DARCÁDIA

UTILIZAÇÃO DE SÍLICA COLOIDAL COMO MÉTODO DE AUXÍLIO NA
SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CANINO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Reprodução, Sanidade e Bem Estar Animal da Universidade José do Rosário Vellano – *Campus* Alfenas/MG para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

Área de concentração: Reprodução Animal

Alfenas, MG

2017

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

Darcádia, Hugo Pieve

Utilização de sílica coloidal como método de auxílio na seleção espermática para criopreservação do sêmen canino. — Angélica Carvalho Cunha.—Alfenas, 2017.

60 f.

Orientador: Prof. Dr Jairo Pereira Neves

Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Reprodução, sanidade e Bem-Estar Animal -Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2017.

1. Androcoll 2. Andrologia 3. CASA 4. Centrifugação 5. Colóide
I. Universidade José do Rosário Vellano II. Título

CDU : 636.082:636.7(043)



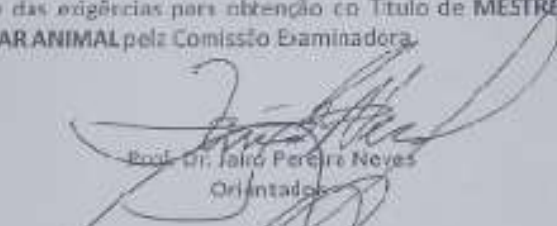
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "UTILIZAÇÃO DE SILICA COLOIDAL COMO METODO DE AUXILIO NA SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CANINO".


Autor: Hugo Pieve Darcádia

Orientador: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves


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



Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Orientador

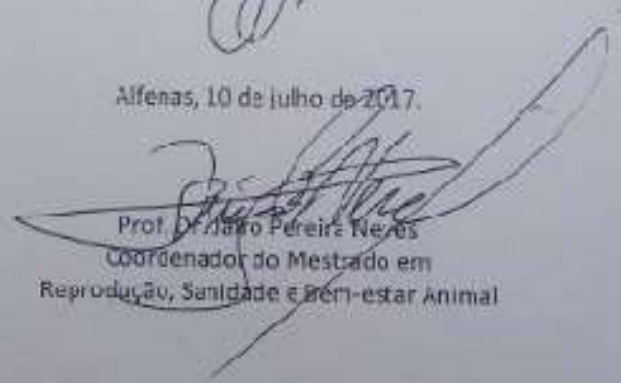


Prof. Dr. Verilton José Siqueira



Prof. Dr. José Antônio Dias Garcia

Alfenas, 10 de julho de 2017.



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

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosane Castro Pieve, que, além de ser o maior exemplo de pessoa, sempre incentivou e apoiou incondicionalmente os meus estudos e foi primordial para a realização dos meus sonhos.

À Carla Pinto Alves, por sempre ouvir e dar conselhos, pelo carinho, companheirismo e incentivo. Por sempre estar ao meu lado. Sem você seria impossível ter chegado até aqui.

Aos meus avós, Maria Aparecida Castro e Antônio Pieve, que sempre ajudaram na minha formação profissional e pessoal. Sou muito grato por tudo que vocês me proporcionaram, qualquer coisa que eu escreva é pouco para demonstrar minha gratidão por vocês.

Ao meu irmão, Gustavo Pieve Darcádia, por ser espelho de grande profissional, pela amizade e boas conversas.

Ao meu pai, José Alberto Darcádia, que mesmo longe apoiou os meus estudos.

Ao Bivaque Pereira Souza, que sempre deu aquela força e não media esforços para auxiliar no que fosse necessário.

À Maria José Ferreira Pinto Alves e Ciro Alves Pinto que são pessoas maravilhosas e pelo apoio e auxílio na realização dessa dissertação.

À Professora Dr^a. Marilu Martins Gioso, por ter apresentado a área tão maravilhosa que é a Reprodução Animal, pela paciência, pelos conselhos, pelos ensinamentos, enfim, por tudo que me proporcionou ao longo desses anos. Muito obrigado por tudo!

Ao Amarildo Rosa, colega de experimentos, grande amigo e profissional. Obrigado pelas conversas e aconselhamentos.

À Tatiana Saito e à Priscila Bittencout que ajudaram muito na realização desse projeto.

Ao Gilson Almeida e William Pires, auxiliares do Laboratório de Reprodução Animal e Patologia Clínica, respectivamente, pelo auxílio, pela amizade e boas risadas.

Aos proprietários que nos forneceram os cães para as coletas: senhores Veber Neto, Professora Tina, Miriam, Henrique e Levy.

Ao professor Márcio Zangerônimo, da Universidade Federal de Lavras, por autorizar o uso dos equipamentos para a realização dos projetos e aos alunos da pós-graduação Priscila, Carla e Fidelis.

À Universidade José do Rosário Vellano, pelo suporte e financiamento para a realização dos experimentos;

À CAPES, pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“A pujante peça continua e podes contribuir com um verso.”

Walt Whitman

RESUMO

PIEVE, H. **Utilização de sílica coloidal como método de auxílio na seleção espermática para criopreservação do sêmen canino.** 2017. 59 f. Dissertação (mestrado em Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal) – Programa de Pós-graduação, Universidade José do Rosário Vellano, 2017.

Objetivou-se comparar as características seminais caninas pós descongelamento de um sêmen previamente centrifugado convencionalmente (grupo controle) e em sílica coloidal. Foram coletadas 36 amostras de sêmen de seis cães saudáveis, avaliando a motilidade, vigor, concentração, morfologia e teste hiposmótico. O ejaculado então foi dividido em duas frações iguais, centrifugado por método convencional e pela sílica coloidal e posteriormente criopreservado. O sêmen centrifugado pelos dois procedimentos apresentou resultados semelhantes ($p < 0,05$), sendo motilidade ($84,72 \pm 8,44$ versus $83,89 \pm 9,93\%$), vigor ($3,97 \pm 0,84$ versus $4,19 \pm 0,71$), concentração ($270,71 \pm 109,05$ versus $263,71 \pm 90,50$ espermatozoides/mL), células morfologicamente normais ($93,60 \pm 4,24$ versus $92,97 \pm 4,61\%$) e teste hiposmótico ($90,26 \pm 4,75$ versus $90,53 \pm 4,42\%$) para o grupo controle e sílica coloidal, respectivamente. Após o descongelamento, as amostras foram examinadas pela análise computadorizada e foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos para os valores de Velocidade curvilínea ($63,07 \pm 22,94$ versus $82,29 \pm 27,84 \mu\text{m/s}$), Velocidade linear progressiva ($21,79 \pm 4,60$ versus $26,85 \pm 9,10 \mu\text{m/s}$), Velocidade média da trajetória ($36,39 \pm 9,94$ versus $45,68 \pm 10,16 \mu\text{m/s}$), Linearidade ($37,06 \pm 8,60$ versus $31,68 \pm 9,80\%$) e Retilinearidade ($61,09 \pm 6,48$ versus $56,09 \pm 7,26\%$) para o grupo controle e sílica coloidal respectivamente. Pode-se concluir que a centrifugação pré-congelamento utilizando a sílica coloidal é tão eficaz quanto a centrifugação seminal convencional, podendo ser uma alternativa e gerando resultados similares aos demais meios já consagrados na literatura.

Palavras-chave: Androcoll, andrologia, CASA, centrifugação, colóide

ABSTRACT

This study aimed to compare the canine semen characteristics after thawing of a semen centrifuged conventionally and in colloidal silica. 36 semen samples from six healthy dogs were evaluated about the motility, vigor, concentration, morphology and hyposmotic test. The ejaculate was divided into two equal fractions and centrifuged in colloidal silica and by the conventional method and subsequently cryopreserved. The centrifuged semen presented similar results ($p < 0,05$) between both treatment, like motility ($84,72 \pm 8.44$ vs $83.89 \pm 9.93\%$), vigor (3.97 ± 0.84 vs 4.19 ± 0.71), concentration (270.71 ± 109.05 vs 263.71 ± 90.50 cels/mL), normal cells (93.60 ± 4.24 vs $92.97 \pm 4.61\%$) and hyposmotic test (90.26 ± 4.75 vs $90.53 \pm 4.42\%$) for the control group and colloidal silica respectively. After thawing the samples from the two experimental groups were examined for computerized analysis parameters and differences ($p < 0.05$) were observed between the groups for the Curvilinear velocity, values (63.07 ± 22.94 vs $82.29 \pm 27.84 \mu\text{m/s}$), Progressive linear velocity, (21.79 ± 4.60 vs. $26.85 \pm 9.10 \mu\text{m/s}$), Average velocity (36.39 ± 9.94 vs. $45.68 \pm 10.16 \mu\text{m/s}$), Linearity (37.06 ± 8.60 vs $31.68 \pm 9.80\%$) and Rectilinearity (61.09 ± 6.48 vs $56.09 \pm 7.26\%$) for the control group and colloidal silica respectively. It can be concluded that pre-freezing centrifugation using colloidal silica is as effective as conventional seminal centrifugation, and may be an alternative generating results similar to those already established in the literature.

Keywords: Androcoll, andrology, CASA, centrifugation, colloide

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão da motilidade, vigor, concentração, patologia e hiposmótico do sêmen fresco dos cães utilizados no experimento.

Tabela 2 - Média \pm desvio padrão da motilidade, vigor, concentração, patologia e teste hiposmótico (integridade de membrana) após a centrifugação do sêmen de 6 cães em CaniPlus Enhance[®] e Androcoll-E[®].

Tabela 3: Média \pm desvio padrão da motilidade, vigor, concentração, patologia e teste hiposmótico (integridade de membrana) após o descongelamento do sêmen de 6 cães em CaniPlus Enhance[®] e Androcoll-E[®].

Tabela 4: Média \pm desvio padrão dos parâmetros de progressão e velocidade do CASA após o descongelamento do sêmen centrifugado em CaniPlus Enhance[®] e Androcoll-E[®].

Tabela 5: Média \pm desvio padrão de parâmetros cinéticos obtidos pelo CASA após o descongelamento do sêmen centrifugado em CaniPlus Enhance[®] e Androcoll-E[®].

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| ABINPET | Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação |
| US\$ | Dólar |
| R\$ | Real |
| SLC | <i>Single Layer Centrifugation</i> (Centrifugação de camada única) |
| CBRA | Colégio Brasileiro de Reprodução Animal |
| % | Porcentagem |
| mL | Mililitro |
| HO | Teste hiposmótico |
| mm | Milímetro |
| mOsm | Osmolaridade |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| TRIS | Tris-hidroximetilaminometano |
| °C | Graus Célsius |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| EROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| ATP | Trifosfato de Adenosina |
| IA | Inseminação Artificial |
| SLU | <i>Swedish University of Agricultural Sciences</i> (Universidade Sueca de Ciências Agrárias) |
| ® | Marca registrada |
| ± | Mais ou menos |
| = | Igual |
| < | Menor |
| CASA | <i>Computer Assisted Sperm Analysis</i> (Análise computadorizada de sêmen) |
| VAP | Velocidade média de trajetória |
| VCL | Velocidade curvilínea |

| | |
|-------------|---|
| VSL | Velocidade linear progressiva |
| STR | Retilinearidade |
| LIN | Linearidade |
| ALH | Amplitude de deslocamento lateral da cabeça |
| BCF | Frequência de batimento flagelar |
| µm | Micrometro |
| s | Segundo |
| Hz | Hertz |
| µL | Microlitro |
| rpm | Rotação Por Minuto |
| ° | Grau |
| Estat | Estáticos |
| Nprog | Não progressivos |
| Prog | Progressivos |
| Rapid | Rápidos |
| Med | Médios |
| Lent | Lentos |
| Androcoll-E | Sílica Coloidal específica para equinos |
| Androcoll-C | Sílica Coloidal específica para cães |

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. OBJETIVOS | 16 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 3.1 A estrutura espermática..... | 16 |
| 3.2 Criopreservação do sêmen..... | 17 |
| 3.2.1 Inseminação artificial e criopreservação do sêmen canino | 21 |
| 3.3 Centrifugação do sêmen canino | 22 |
| 3.4 Androcoll-E..... | 24 |
| 3.5 Análise seminal | 24 |
| 3.5.1 Motilidade e vigor | 24 |
| 3.5.2 Concentração espermática | 25 |
| 3.5.3 Morfologia espermática | 25 |
| 3.5.4 Teste hiposmótico | 26 |
| 3.6 Análise computadorizada do espermatozóide..... | 26 |
| 3.6.1 Funcionamento do CASA | 27 |
| 3.6.2 Análise das imagens e obtenção dos parâmetros de motilidade..... | 27 |
| 3.6.3 Parâmetros da motilidade espermática avaliados pelo CASA..... | 27 |
| 3.6.4 Avaliação da fertilidade | 28 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 29 |

CAPÍTULO 2

| | |
|---|-----------|
| Artigo: Diferentes meios de refrigeração como método de preservação do sêmen canino..... | 1 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 4 |
| RESULTADOS e DISCUSSÃO | 4 |
| CONCLUSÕES | 11 |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 11

ANEXO

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem papel de destaque no segmento de mercado pet, segundo a ABINPET (2017), ele ocupou a terceira colocação em faturamento no ano de 2016 com 5,14% do faturamento mundial. Dessa maneira, a criação especializada de cães de raça se tornou uma atividade rentável e como consequência houve necessidade de biotécnicas para melhor aproveitamento do material genético de reprodutores caninos.

Uma das biotécnicas reprodutivas em destaque é a criopreservação do sêmen que possibilita um melhor aproveitamento de ejaculados oriundos de um mesmo reprodutor, bem como facilita a propagação deste material genético para diferentes regiões do planeta, mesmo após a morte do animal (SILVA et al., 2001).

Além disso, a utilização do sêmen canino congelado tem a vantagem de permitir a manutenção da capacidade fecundante em animais de alto interesse zootécnico por um espaço indeterminado de tempo, além de resguardá-los do estresse causado pelo transporte para fins de acasalamento (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989).

Para amenizar as injúrias provocadas pela ação dos crioprotetores, atualmente, a utilização de coloides em uma única camada para a centrifugação de sêmen tem sido estudada na proposta de melhorar a viabilidade de células espermáticas pré-congelamento e pós-descongelamento, obtendo melhorias nos padrões de qualidade espermática (DORADO et al., 2013).

O Androcoll-E[®] (*Minitub[®]; Swedish University of Agricultural Sciences SLU, Uppsala, Sweden*) é o coloide cuja formulação é composta por sílica coloidal revestida por silano e é específico para equinos (JOHANNISSON et al., 2009). Após análises seminais, foi observado que ele promove melhora da qualidade do sêmen equino fresco (MORRELL et al., 2009a), congelado (MACIAS GARCIA et al., 2009; HOOGEWIJS et al., 2011) e resfriado (MORRELL et al., 2009d; BERGQVIST et al., 2011) com um tempo de preparação menor e processamento menos complicado que o normalmente praticado na centrifugação de gradiente de densidade (MORRELL et al., 2009b). Porém poucos são os relatos destes na espécie canina, sendo largamente utilizado na espécie equina (HOOGEWIJS et al., 2011).

Por esta razão, este trabalho objetivou submeter as células espermáticas caninas em um meio coloide de camada única anterior ao congelamento do sêmen, na tentativa de melhorar as características seminais de cães.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Testar a eficácia da centrifugação seminal em sílica coloidal na proteção e manutenção das características de células espermáticas caninas anteriormente ao processo de congelamento.

2.2 Específicos

- Avaliar os parâmetros de motilidade, vigor, concentração, morfologia e integridade de membrana do sêmen canino após centrifugação convencional e em sílica coloidal e após o descongelamento.
- Avaliar, por análise computadorizada, os parâmetros específicos de motilidade do sêmen canino após descongelamento, previamente centrifugado convencionalmente e em sílica coloidal.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A estrutura espermática

O espermatozoide é uma célula altamente polarizada e especializada que perde a habilidade de biossíntese, reparo, crescimento e divisão celular durante a fase final da espermatogênese (YOSHIDA, 2000). Os espermatozoides podem ser divididos em três estruturas distintas: cabeça, cauda e peça intermediária.

A cabeça, cuja forma, tamanho e estrutura variam entre as espécies e possui duas regiões: acrossomal e pós-acrossomal (SIQUEIRA, 2004). A característica principal da cabeça do espermatozoide é o núcleo achatado de forma oval, contendo a cromatina altamente compacta. A extremidade anterior do núcleo espermático recoberta pelo acrossoma, uma fina cobertura com dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo (HAFEZ, 1995).

A cauda do gameta masculino é composta pelo colo, peça intermediária principal e terminal. A região da cauda entre o colo e o *annulus* é a peça intermediária. A parte central da peça intermediária, junto com o comprimento total da cauda forma o axonema, onde ocorre a transformação de energia química em mecânica. Contudo, esse conjunto é recoberto externamente por várias mitocôndrias dispostas em forma de hélice, que geram a energia necessária para a motilidade espermática (BEDFORD & HOSKINS, 1990).

A membrana plasmática é responsável por envolver todo o espermatozoide e é composta por camadas lipídicas e de proteínas as quais contém fosfolipídios, colesterol, glicolipídios, e diferentes tipos de proteínas (ALBERTS et al., 1997). As membranas exercem um papel fundamental na manutenção da capacidade fertilizante do espermatozoide. A membrana plasmática é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atuando como uma barreira entre o meio intra e extracelular. Lesões nessa estrutura podem levar a perda da homeostase, levando à morte celular (FLESH & GADELLA, 2000).

Três lipídeos fazem parte das membranas: fosfolipídios, glicolipídios e colesterol, sendo que dentre estes, os fosfolipídios são os mais abundantes (ALBERTS et al., 1997). Sendo o colesterol o principal esterol presente nos espermatozoides e nas membranas celulares dos mamíferos, possuindo importante papel de modular a fluidez e a estabilidade da bicamada lipídica através da sua interação estérica com os fosfolipídios de membrana (PARKS, 1997). Em geral, quanto maior a quantidade de colesterol presente, menos flexível, e/ou menos fluida é a porção da membrana (AMANN & PICKETT, 1987). A resistência ao choque pelo frio é maior nas espécies em que a proporção colesterol: fosfolipídios da membrana plasmática são altos (VALLE & SILVA FILHO, 2001).

A membrana plasmática apresenta cerca de 50% de sua massa constituída por proteínas. Portanto, a parte exterior da célula consiste em grande parte de carboidratos, que formam uma cobertura celular, exercendo função primordial na interação com o ovócito (ALBERTS et al., 1997).

3.2 Criopreservação do sêmen

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia de grande impacto na reprodução animal, pois visa à suspensão do metabolismo espermático e à manutenção de suas características por um tempo prolongado, quando mantido em nitrogênio líquido (PESCH & HOFMAN, 2007). A reprodução animal obteve inúmeros benefícios com a criopreservação, permitindo o maior aproveitamento de animais com alto potencial genético e reprodutivo, o transporte do sêmen a longas distâncias e a 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 (BERTOZOO & ZÚCCARI, 2008).

O processo de criopreservação das células espermáticas resulta na diminuição da fertilidade quando comparada ao sêmen fresco. Esse prejuízo surge da combinação de alguns aspectos, como perda da viabilidade espermática ou danos na capacidade funcional dos espermatozoides, uma vez que a motilidade e a estrutura dos espermatozoides são afetadas de

diferentes formas, podendo ocorrer injúrias nas diferentes etapas de congelamento e descongelamento (WATSON, 2000).

A refrigeração e o congelamento do sêmen só são possíveis com o uso de meios diluentes capazes de conservar uma boa motilidade e integridade da membrana espermática pré e pós-congelamento/descongelamento (BOUCHARD et al., 1990). O diluente é capaz de proteger a membrana espermática dos danos causados pela modificação de temperatura. Adicionalmente, o diluente também é constituído de fontes de energia e mantém estáveis o pH e a osmolaridade (MARSHALL e HUGH, 1990). JOHNSTON et al., (2001) aponta que um bom diluidor possui osmolaridade entre 300 e 325 mOsm e pH de 6,75 e 7,50 e contém ainda antibióticos que evitam a contaminação bacteriana (ROTA et al., 1995). Além disso, o meio diluente mantém a concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos e possui crioprotetores que protegem as células de lesões provocadas pelo choque térmico, oriundo do processo de resfriamento (CONCANNON e BATTISTA, 1989). Assim, pode-se dizer que a manutenção das estruturas espermáticas após o congelamento é devida à interação entre diluentes, crioprotetores e curvas de resfriamento, buscando minimizar os danos causados pelo choque frio, desidratação celular e formação de cristais de gelo (CELEGHINI, 2005)

Os diluentes de congelamento de sêmen são compostos com uma ampla variedade de substâncias quimicamente diferentes entre si (açúcares, substâncias tampões, antibióticos), que têm a finalidade de manter os espermatozoides viáveis até o momento de serem introduzidos no trato genital da fêmea (FERREIRA et al., 2005). A composição dos meios diluidores apresenta grande influência sobre a sobrevivência espermática durante o processamento, observando-se uma importante interação entre os componentes do meio e as curvas de refrigeração/congelamento (CHAVEIRO et al., 2006).

Vários diluentes para conservação de sêmen já foram estudados. Na maioria dos trabalhos realizados utilizou-se o meio TRIS/gema de ovo, contendo frutose ou glicose, meio citrato/gema de ovo e meios comerciais (TSUTSUI et al., 2003). Atualmente, o meio crioprotetor comercial CaniPlus Freeze® (a base de TRIS) acrescido de 20% de gema de ovo, tem sido utilizado, proporcionando resultados adequados na criopreservação de sêmen canino (DORADO et al., 2011a).

O sucesso do congelamento do sêmen canino é afetado por muitas variáveis, dentre elas o potencial tóxico do agente crioprotetor, particularmente relativo à concentração, duração e a temperatura em que o sêmen é exposto ao mesmo. Dos componentes essenciais aos meios de criopreservação estão as substâncias iônicas e não iônicas responsáveis pela manutenção da osmolaridade e tamponamento dos diluentes, sendo os crioprotetores como

glicerol, etilenoglicol e DMSO (dimetilsulfóxido), fontes de lipoproteínas de alto peso molecular necessárias para prevenção do choque frio.

A gema de ovo é bastante utilizada como agente crioprotetor não permeável nos diluidores de criopreservação, atuando na proteção espermática contra o choque frio (MOUSSA et al., 2002). Como fonte de energia utilizam-se açúcares como, glicose e frutose, além de aditivos como antibióticos, antioxidantes, enzimas e detergentes (VISHWANATH & SHANNON, 2000). Os açúcares simples representam a principal fonte de energia presente nos diluentes, oferecendo suporte à manutenção celular e ao movimento espermático. Os antibióticos no diluente de congelamento têm uma importante função no controle de crescimento microbiano do sêmen (GRIFFIN, 2004).

Na maioria dos protocolos desenvolvidos para a criopreservação espermática, o glicerol é o agente mais utilizado, variando grandemente entre as espécies, sendo que a concentração ideal é frequentemente comprometida entre o efeito crioprotetor e a toxicidade.

Como nas demais espécies, a ausência do glicerol durante a criopreservação do espermatozoide canino reduz significativamente a recuperação espermática no pós-descongelamento. Vários pesquisadores têm descrito o uso do glicerol, variando a concentração de 2 a 16% para criopreservação do sêmen canino, dependendo da composição do diluidor utilizado (revisado por SANTOS et al., 2003).

A crioproteção do glicerol tem sido avaliada pela motilidade espermática no pós-descongelamento. Porém, a integridade acrossômica e longevidade do sêmen canino pós-descongelado e incubado à temperatura fisiológica em diferentes concentrações de glicerol ainda é pouco estudado (PEÑA et al., 1998). Estes autores compararam concentrações de 2, 4, 6 e 8% de glicerol e glicerolização a temperaturas de 37°C e 4°C para congelamento do sêmen canino, e concluíram que a glicerolização a 37°C na proporção de 8%, proporcionaram os melhores índices de motilidade, viabilidade e morfologia espermática no pós-descongelamento.

Outro aspecto da criopreservação do sêmen canino refere-se ao tempo de refrigeração e estabilização. A cada acréscimo de quaisquer substâncias (meio diluidor + crioprotetor) ao sêmen, há necessidade de permitir um tempo de equilíbrio entre elas, sendo que este tempo é considerado o tempo total em que os espermatozoides são mantidos em contato com o glicerol e todos os demais componentes do diluente, previamente ao congelamento. Durante esse período, ocorre o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e extracelular (CASTELO et al., 2008).

A refrigeração representa o início do estresse térmico ao qual são submetidas as células espermáticas durante o processo de criopreservação. Pois a rápida refrigeração do sêmen das diferentes espécies animais induz a um estresse letal conhecido como choque frio (STORNELLI et al, 2005).

A sensibilidade espermática ao choque frio é influenciada pela composição dos fosfolipídios e pela relação colesterol/fosfolipídios de membrana, que é particularmente menor em espécies mais sensíveis ao choque frio e à criopreservação (MORAES et al., 2010). O choque frio caracteriza-se pela queda irreversível da motilidade espermática e alterações na estrutura da membrana, pois ocorre um rearranjo dos fosfolipídios passando do estado líquido para gel, levando ao aumento da permeabilidade da célula. (STORNELLI et al., 2005).

A criopreservação também causa estresse físico e químico, alterando a membrana dos espermatozoides, diminui irreversivelmente a motilidade espermática, provoca aumento da degeneração do DNA e liberação intracelular de enzimas, lipídeos e proteínas (BRANDÃO et al, 2006). Durante a criopreservação e descongelamento, ocorrem danos como a formação de cristais de gelo intracelular, aumento da concentração intracelular de soluto e modificações resultantes da desidratação celular durante o congelamento. As lesões celulares podem ser causadas diretamente - afetam estruturas celulares (ruptura de membranas) ou indiretamente, com alteração nas funções celulares através do processo metabólico (HOLT, 2000).

A formação de cristais de gelo, durante o processo de congelamento, implica aumento na quantidade de sais que são prejudiciais aos espermatozoides. Essa alta concentração de sais provoca lesões na membrana plasmática, desnaturação de proteínas e danos irreversíveis (AMANN & PICKETT, 1987). Durante o congelamento, os espermatozoides são submetidos à produção de EROS que podem induzir a mudanças na estrutura e nas funções espermáticas (BALL et al., 2001), e também no sistema de defesa dos antioxidantes (BILODEAU et al., 2000).

Existem diferenças na composição lipídica da membrana plasmática entre as espécies, raças e ainda indivíduos da mesma espécie, o que pode explicar o maior ou menor efeito protetor do diluente ao espermatozoide de um determinado indivíduo (HOLT, 2000). Aqueles em que o sêmen tolera os efeitos da criopreservação são denominados de bons congeladores (WATSON, 2000).

A velocidade de congelamento é importante, pois as temperaturas de aquecimento dependem diretamente da velocidade do congelamento. Se o congelamento for lento, o descongelamento também deve ser lento, permitindo assim a fusão dos cristais de gelo extracelulares. O descongelamento dos cristais provoca diluição dos solutos e ocorre

lentamente a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado rapidamente, os cristais de gelo extracelulares descongelam-se muito rapidamente e a água invade bruscamente as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática (HOLT, 2000).

Assim, as alterações irreversíveis na membrana do espermatozoide (distúrbios na estrutura lipídica e proteica), tais como: aumento da permeabilidade, danos acrossomais, desidratação e redução da enzima fosfolipídica, atividade metabólica reduzida e diminuição do consumo de ATP, são consequências de refrigeração e congelamento, as quais podem parcialmente ou totalmente, comprometer a fertilidade do sêmen. Em cães, poucos trabalhos estudaram os diferentes tempos de equilíbrio antes de o sêmen ser submetido ao processo de congelamento.

O método de criopreservação de sêmen canino mais usual é aquele descrito por ANDERSEN, (1975). Neste método, foi realizada a diluição do sêmen a 37°C em Tris, acrescido de 20% de gema de ovo e glicerol. Em seguida, procedeu-se a um período de equilíbrio de três horas, seguido do envase em palhetas plásticas e à exposição aos vapores de nitrogênio para congelamento. Atualmente, esse método tem servido como base para inúmeros trabalhos onde têm sido realizadas pequenas modificações, alcançando resultados distintos *in vitro* (ROTA et al., 2006) e *in vivo* (THOMASSEN et al., 2006).

Atualmente, em cães, a metodologia mais utilizada para o congelamento do sêmen segue o descrito por MARTINS, (2005) e CHIRINÉIA et al., (2006). Estes autores realizaram a diluição de sêmen a 37°C, imediatamente seguida do envase em palhetas de 0,5 mL. Em seguida, transferiram as amostras para um refrigerador programado a 5°C por uma hora e, finalmente, expuseram as palhetas ao vapor de nitrogênio por 20 min, sendo o sêmen armazenado em botijão criogênico.

3.2.1 Inseminação artificial e criopreservação do sêmen canino

Os primeiros estudos relacionados a IA e conservação do sêmen de cães foram feitos por Lázaro Spallanzani, no final do século XVIII (ENGLAND, 1993). Embora os árabes tenham usado a IA em equinos, no século XIV (1332), antes de Spallanzani, acredita-se que seus estudos foram os primeiros dos tempos modernos a obter uma gestação por IA, utilizando o cão como modelo. Em 1780, este pesquisador colheu o sêmen por sifonagem da vagina de uma cadela, acasalada naturalmente, para inseminar outra cadela no cio, da qual nasceram três filhotes. Foi também Spallanzani, em 1776, o primeiro a observar que a diminuição na temperatura reduzia reversivelmente a atividade metabólica dos espermatozoides, permitindo dessa forma sua estocagem (JOHNSTON et al., 2001).

Em 1949, a descoberta da ação crioprotetora do glicerol, por Polge, proporcionou um impacto significativo na metodologia da criopreservação dos espermatozoides. Rowson, em 1954, descreveu a técnica de congelamento na espécie canina e, em 1956, Harrop obteve uma gestação de cão por inseminação com sêmen refrigerado (JOHNSTON et al., 2001). Em 1969, Seager conseguiu a primeira gestação canina com sêmen criopreservado.

Somente durante as últimas décadas, o interesse pela inseminação artificial (IA), em cães, cresceu substancialmente em nosso país. No Brasil, a primeira notificação de sucesso em inseminação artificial com sêmen canino congelado foi realizada a pouco mais de 23 anos, tendo sido obtida uma ninhada de seis cães normais da raça Boxer (VASKE et al., 1981). Posteriormente, outros pesquisadores publicaram relatos de IA com sêmen refrigerado e criopreservado, como SILVA et al., (2004), seguido por APPARÍCIO et al., (2007) e UCHOA et al., (2007).

Na espécie canina, um sêmen que apresenta uma boa viabilidade espermática, de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) apresenta: volume variável, motilidade maior que 70%, vigor maior que três, concentração espermática acima de 200×10^6 de espermatozoides/mL e patologias totais inferiores a 30%, sendo o limite máximo 10% para patologias maiores e 20% para menores. Além disso, um teste complementar como o teste hiposmótico (HO) se faz necessário para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática, sendo este teste importante na avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado, uma vez que tanto o congelamento quanto o resfriamento podem levar a efeitos deletérios sobre a membrana (MELO et al., 2005).

3.3 Centrifugação do sêmen canino

Atualmente, as técnicas de classificação de espermatozoides por centrifugação coloidal são capazes de melhorar a qualidade do espermatozoide criopreservado e selecionar os espermatozoides mais viáveis (potencialmente férteis) em uma população onde a maioria está danificada ou morta. Assim, a seleção de espermatozoides poderia ser um pré-requisito para a melhoria das taxas de gestação após a inseminação artificial com sêmen descongelado de cães. A centrifugação por coloide, portanto, seleciona os espermatozoides em subpopulações que são altamente móveis, têm morfologia normal, membranas íntegras e boa integridade da cromatina do restante do ejaculado (MORRELL et al., 2008).

De acordo com MORRELL, (2011), a camada única para centrifugação (SLC) de espermatozoides por um coloide específico demonstrou ser eficaz na escolha dos melhores espermatozoides em sêmen de garanhão. Descreveu ainda que o método apresenta fácil

utilização e permite que todo ejaculado possa ser processado de uma maneira prática. Desta maneira, as principais aplicações do SLC são: melhorar a qualidade do espermatozoide para os procedimentos de inseminação artificial, para aumentar a viabilidade espermática no sêmen fresco e após o processo de descongelamento; contorna o problema de espermatozoides que não toleram o resfriamento até 4-6 °C, seleciona apenas espermatozoides viáveis para a criopreservação, seleciona apenas os espermatozoides vivos pós-descongelamento, seleciona espermatozoides morfolologicamente normais com cromatina intacta, remove patógenos (vírus, bactérias), acelera o processo de seleção sexual por citometria de fluxo pela retirada dos espermatozoides inviáveis antes da passagem pelo feixe de laser e, ainda, para conservar espécies raras.

Adicionalmente a estas informações, MORRELL et al., (2008), utilizando um coloide de camada única (Androcoll-C[®]) para sêmen canino, após o descongelamento em meio Tris-gema de ovo, avaliaram a motilidade espermática, viabilidade espermática e integridade de acrossoma por corantes fluorescentes (SYBR-PI e FITC-PNA, respectivamente) e a morfologia espermática, quando comparado ao descongelamento usual, sem adição de quaisquer substâncias. Os resultados deste trabalho revelaram que a adição do coloide pós-descongelamento apresentou diferenças estatísticas nos resultados da motilidade e da morfologia espermática, sem comprometimento da viabilidade e integridade de acrossoma.

DORADO et al., (2013) objetivaram investigar se a centrifugação de camada única (SLC) com Androcoll-C[®] poderia selecionar espermatozoides de boa qualidade, incluindo aqueles com padrões de motilidade específicos, a partir de doses de sêmen, de cães, congeladas. O sêmen de cinco cães foram recolhidos e criopreservados, seguindo um protocolo padrão. Após descongelamento, as amostras de sêmen foram divididas em duas alíquotas, uma das quais foi utilizada como controle e a outra, processada por SLC. Avaliação da motilidade espermática (avaliada através da análise computadorizada), morfologia, viabilidade e integridade acrossômica (utilizando corantes fluorescentes) foram realizadas em alíquotas de sêmen fresco, amostras de controle congelados e descongelados, e preparações tratadas com SLC congelados e descongelados. Estes autores concluíram que, para amostras de sêmen de cães selecionados pelo Androcoll-C[®] após o descongelamento, os parâmetros de qualidade do sêmen, incluindo padrões de motilidade, são melhores do que em amostras de controle congelados e descongelados.

3.4 Androcoll-E

Conforme revisado por Morrell & Rodriguez-Martinez em 2010, um método para seleção de espermatozoides foi desenvolvido pela *Swedish University of Agricultural Sciences*

(*SLU*), utilizando a centrifugação em camada única através do uso de colóides espécie específicos (Androcoll®). Esse colóide objetiva a seleção de espermatozoides com boa motilidade, morfologia normal, membranas plasmáticas intactas e cromatina íntegra.

O Androcoll-E® é o colóide cuja formulação é composta por sílica coloidal revestida por silano e é específico para equinos (JOHANNISSON et al., 2009). Após análises seminais, foi observado que ele promove melhora da qualidade do sêmen equino fresco (MORREL et al., 2009a), congelado (MARCAS GARCIA et al., 2009; HOOGEWIJS et al., 2011) e resfriado (MORRELL et al., 2009d; BERGQVIST et al., 2011) com um tempo de preparação menor e processamento menos complicado que o normalmente praticado na centrifugação de gradiente de densidade (MORRELL et al., 2009b).

3.5 Análise Seminal

3.5.1 Motilidade e vigor

A avaliação da motilidade espermática é definida com o percentual de espermatozoides móveis em uma amostra de sêmen e o vigor é a intensidade de seu movimento (DERIVAUX, 1980). Essa avaliação da motilidade espermática deve ser realizada imediatamente após a colheita ou descongelamento do sêmen, com auxílio de microscopia óptica de luz (SEAGER & FLETCHER, 1972), em microscópio de contraste de fase ou em analisador computadorizado (HTR-IVOS ANALYSER, Hamilton Thorn Research), assim como as análises do vigor espermático.

A relação desse parâmetro com a capacidade fecundante do espermatozoide canino não está completamente elucidada; atualmente, a maioria dos pesquisadores ainda utiliza a motilidade como principal parâmetro para a avaliação de diluentes, crioprotetores e técnicas de criopreservação do sêmen canino (IVANOVA-KICHEVA et al., 1997; SILVA et al., 2003). Porém, este tipo de análise é impreciso até mesmo quando executada por pesquisadores experientes, tais análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão é resultado, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2004, 2005, 2006b, CELEGHINI, 2005). IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001 ainda atentam a outros fatores que influenciam na análise da motilidade como a temperatura do local onde está sendo realizada e a habilidade do avaliador, levando em conta a elevada variabilidade entre laboratórios.

3.5.2 Concentração espermática

Concentração espermática é dada na relação entre número de espermatozoides e a quantidade em mililitro de plasma seminal. No cão, a concentração espermática ideal é de aproximadamente $247 \pm 9,9 \times 10^6$ espermatozoides/mL (SILVA et al., 2002).

A concentração espermática é muito variável entre cães, normalmente os cães maiores produzem mais espermatozoides que os menores (ROOT e JOHNSTON, 1994). VANNUCCHI et al., (1998) relataram a idade, a atividade reprodutiva do macho, o método de colheita e a diluição do plasma seminal como outros fatores que também influenciam na quantidade de espermatozoides no ejaculado. Cães muito novos ou muito velhos diminuem a produção espermática e ainda que ao final do verão a concentração caia em relação a primavera ou ao início do verão, mas ainda permanecem em valores normais (FRESHMAN, 2002).

3.5.3 Morfologia espermática

Mamíferos com boa fertilidade normalmente possuem alta porcentagem de espermatozoides normais e uniformes (OMBELET et al., 1995). Segundo OETLLÉ (1993), a avaliação da morfologia espermática é o teste que apresenta maior correlação com a fertilidade, após observação de que cães que apresentavam mais de 60% de espermatozoides normais obtiveram taxa de fertilidade de 61%, enquanto outros, com menos de 60% de células espermáticas normais, mostraram uma taxa de fertilidade de apenas 13% após inseminação utilizando sêmen fresco. Apesar destes fatos, cães com baixa qualidade do sêmen podem ser férteis usando-se o acasalamento natural (ENGLAND & ALLEN 1989).

Existem várias maneiras de se classificar morfologicamente as células espermáticas de acordo com suas alterações. Uma das formas mais utilizadas de classificação é a estabelecida por BLOM (1973), que classificou as alterações anatômicas do espermatozoide em duas classes: Defeitos maiores e Defeitos menores. Considerou como “Defeitos maiores” qualquer tipo de anormalidade correlacionada com prejuízos de fertilidade ou com uma condição patológica do testículo ou epidídimo, dentre elas: subdesenvolvimento, formas duplas, Knobbed sperm, decapitado, diadema, piriforme, estreito na base, contorno anormal, cabeça pequena anormal, cabeça destacada anormal, peça intermediária em saca-rolhas, outros defeitos de peça intermediária, gota proximal, cauda fortemente dobrada ou enrolada. Ainda classificou como “Defeitos menores” outros desvios 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. De acordo com o Manual para Avaliação Andrológica do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), os animais reprodutores podem apresentar, no máximo, 20% de defeitos menores e 10% de defeitos maiores em seus ejaculados.

3.5.4 Teste hiposmótico

O teste hiposmótico é o teste realizado para avaliar a integridade funcional da membrana espermática (MELO et al., 2005). A avaliação da funcionalidade da membrana pode ser usada como um indicador da capacidade de fertilizar do espermatozoide (JEYENDRAN et al., 1984). HIDEKI et al., (1993) observou uma relação positiva entre a porcentagem de enrolamento de cauda em espermatozoides e sua motilidade em sêmen humano.

O teste hiposmótico foi desenvolvido por JEYENDRAN et al., (1984) baseado na reação do espermatozoide frente a um meio hiposmótico. Na tentativa de equilibrar os meios extra e intracelular, a água penetra na célula através da membrana, provocando um edema. A capacidade da cauda espermática em se enrolar, devido ao edema provocado pela solução hiposmótica, evidencia que o transporte de água através da membrana está acontecendo de maneira normal, significando que a membrana está íntegra e funcional.

3.6 Análise computadorizada de espermatozoides

A qualidade do sêmen é avaliada pela sua motilidade, vigor e morfologia, porém a avaliação subjetiva pode levar a variações significativas de resultados. Para otimizar o processo de análise seminal, têm sido desenvolvidos e utilizados sistemas automáticos (CASA) , visando a uma maior confiabilidade e velocidade das análises (AMANN E HAMMERSTEDT, 1980; VERSTEGEN et al., 2002). O CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) é um sistema automático (*hardware e software*) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN E KATZ, 2004).

3.6.1 Funcionamento do CASA

Utiliza-se videomicrografia que faz o monitoramento constante e análise sequencial do movimento da cabeça do espermatozoide. O tamanho mínimo e máximo aceitável para a

cabeça do espermatozoide de cada espécie é padronizado pelo sistema (MORTIMER, 2000; AMANN E KATZ, 2004).

Por meio do uso de microscópio com contraste de fase, as células espermáticas são mais claramente visualizadas no meio onde elas se encontram, o que permite a detecção e o rastreamento dessas células. O processo de detecção automática das células, denominado segmentação, é então realizado pelo sistema comparando a intensidade da imagem adquirida com um limiar de intensidade pré-estabelecido (MORTIMER, 2000).

3.6.2 Análise das imagens e obtenção dos parâmetros de motilidade

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é importante devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN et al., 2002, MATOS et al., 2008).

A imagem captada pela câmera acoplada ao microscópio é convertida em imagem digital e a sequência de diversas imagens digitais dá origem a um filme, sendo que cada conjunto de imagens captadas em diversos campos de observação da amostra espermática em avaliação são automaticamente analisadas (DONALD et al., 1988).

O software reconhece as células e desenha para cada espermatozoide uma sequência completa do movimento para reconstituir sua trajetória, classificando-a conforme os padrões definidos como: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel (MORTIMER, 2000). Outras características de movimento espermático são calculadas, fornecendo parâmetros de motilidade como: porcentagem de móveis, 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).

3.6.3 Parâmetros da motilidade espermática avaliados pelo CASA

Segundo VERSTEGEN *et al.*, (2002):

Velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$): É a velocidade da trajetória real do espermatozoide. É sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade.

Velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$): É a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide. É sempre a mais baixa das três velocidades.

Velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$): é a velocidade da trajetória média do espermatozoide. Em casos onde a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear

com pouco movimento lateral da cabeça, a VAP é quase a mesma que a VSL, porém com trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que a VSL.

Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm): é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização.

Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz): É o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento. Se existem mais batimentos/segundos que imagens/segundos, então, a BCF irá ser subestimada.

Retilinearidade (STR - %): É a relação percentual entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

Linearidade (LIN - %): Relação percentual entre VSL e VCL, ou seja, é a porcentagem de célula que tem index linear > 0.7 , ângulo absoluto menor que 25° e ângulo algébrico menor que 3° . Quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade (Mortimer, 2000).

Os valores de velocidade são determinados como percurso relevante percorrido em um período de tempo e são representados em $\mu\text{m/s}$, enquanto os valores de LIN, e STR são determinados como raio dos valores de velocidade (Amann e Katz, 2004).

3.6.4 Interpretação dos parâmetros

Os valores dos parâmetros analisados pelo CASA tais como VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilização de oócito é menor que 50% (VERSTEGEN et al., 2002). Amostras com elevados valores desses parâmetros de velocidade e de LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN et al., 2002).

4. REFERÊNCIAS

ABINPET – **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação.**

Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado/>>. Acesso em 30 maio de 2017.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da célula.** 3. ed. São Paulo : Editora Artes Médicas, 1997.1294 p.

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

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biology Reproduction**, Pennsylvania, v.23, n3, p.6478-645, out.1980.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, California, v.7, n. 3, p. 145-173, 1987.

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

APPARÍCIO, M. et al. Inseminação artificial com sêmen refrigerado por 48 e 72 horas em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2007. p.181.

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

ARRUDA, R. P. et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA ,1., 2004, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: [s.n.], 2004. v.1, p. 166-179.

ARRUDA, R. P. et al. Importance of semen quality in fixed-time artificial insemination and embryo transfer program. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, n.1, p.145-150, 2005.

ARRUDA, R. P. et al. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: [s.n.], 2006b. p.157-164.

BALL, B. A.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.62, n. 4, p.508- 515, abr.2001.

BEDFORD, J. M. E 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.

BERGQVIST, A. S. et al. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa through Androcoll-E does not adversely affect their capacitation-like status, as measured by CTC staining. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 46, n. 1, p. 74-8, jan.2011.

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 plasmática e acrossomal**. 2008. <Disponível em: <http://www.propp.ufms.br> > Acesso em: 23out.2016.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 55, n. 3, p. 282-288, mar.2000.

BLOM E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, Copenhagen, v.25, n 7, p.383-391, jul/ago.1973.

BOUCHARD, G. F.; MORRIS, J. K.; SIKES, J. D.; YOUNGQUIST, R. S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. **Theriogenology**, Philadelphia, v.34, n. 1, p.147-157, jul.1990.

BRANDÃO, A. C. et al. Influência do glicerol e etilenoglicol e da criopreservação sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozoides em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, p. 68-73, 2006. Suplemento.

CASTELO, T. S. et al., Considerations on goat semen cryopreservation. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.2, n.3, p.67-75, set.2008

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

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.

CHAVEIRO, A. et al. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic Supports. **Theriogenology**, Philadelphia, v.65, n.9, p.1875-1890, jun.2006.

CHIRINEA, V. H.; SICHERLE, C. C.; LOPES, M. D. Congelamento de sêmen e sua eficiência na inseminação artificial de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.164-168, abr/jun. 2013.

CHIRINÉA, V. H. et al. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.7, n.4, p.407-415, out/dez.2006.

CONCANNON, P. W. ; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk RW. (Ed.). **Current veterinary therapy**. Philadelphia: WB Saunders, 1989. p. 1247-1259.

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

DONALD, T.S.; HICKMAN, R.; HOSKINS, D.D. Description, validation and performance characteristic of a new computer-automated sperm motility analysis system. **Biology Reproduction**, New York, v.38, n. 3, p.577-586, abr.1988.

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

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

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

ENGLAND, G. C. W.; ALLEN, W. E. Crystallization patterns in anterior vaginal fluid from bitches in oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.86, n. 1, p.335-339, maio 1989.

FERREIRA, F. M. et al. Comportamento de monta e características seminais de suínos jovens landrace e large white. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p.131-137, jan/fev.2005.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysic**, Amsterdam, v. 1469, n. 3, p.197-235, nov.2000.

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

GRIFFIN, E. M. **Development of an extender protocol to enhance the viability of frozen-thawed bovine spermatozoa**. 2004. 212f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Texas A&M University, Houston/Texas, USA, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Ciclos reprodutivos. **Reprodução Animal**.7. ed. Barueri: Manole , 2004. Cap. 4, p. 55-68.

HIDEKI, F.; MASASHI, I.; TAKASHI, K. Correlation between the hypoosmotic swelling test and various sperm function tests. **International Journal of Fertility**, Washington, v.38, n.3, p. 311-315, set/out.1998

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

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

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

IVANOVA-KICHEVA, M. G.; BOBADOV, N. D.; SOMLEV, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, Philadelphia, v.48, n. 8 p.1343- 1349, dez.1997.

JEYENDRAN, R. S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.70, n.1, p.219-228, jan.1984.

JOHANNISSON, A. et al. Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. **Animal Reproduction Science**, Manchester, v. 116, n. 1-2, p. 119-128, nov.2009.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OSLOM, P. N. S. Semen collection, evaluation and preservation. In: _____. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. Cap.16, p.287-306.

LINDE – FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 39, p.299 – 310, 1989. Suplemento

MACIAS GARCIA, B. et al. Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. **Animal Reproduction Science**, Manchester, v. 114, n. 1-3, p. 193-202, ago. 2009.

MARSHALL, F. e HUGH, A. Reproduction in the male in Marshall's physiology of reproduction book. **Churchil Livingstone**, London, v.2 p.769-775,1990.

MARTINS, M. I. M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. 2005. 123 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n. 4, p.225-232, out/dez. 2008.

MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.6, p.757-763, dez.2005.

MORAES, E. A. et al. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction**, Manchester, v. 118, n. 2-4, p. 148-154, abr.2010.

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**, Malden, v. 43, n. 1, p. 61, fev.2008.

MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. **Veterinary Medicine International**, New York, v. 2011, p.1-9, ago.2010

MORRELL, J. Biomimetics in Action: Practical Applications of Single Layer Centrifugation for equine breeding. **Veterinary Science Technology**, Los Angeles, v. 2, n.2, p. 2, set, 2011.

MORRELL, J. M. et al. Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility, velocity and chromatin integrity during storage. **Journal of Equine Veterinary Science**, California, v.29, n. 1, p. 24-32, jan. 2009a.

MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Biometric techniques for improving sperm quality in animal breeding: A review. **The Open Andrology Journal**, Sharjah, v. 1, n.1, p. 1-9, 2009b.

MORRELL, J. M. et al. Single Layer Centrifugation with Androcoll™-E can be scaled-up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 72, n. 6, p.879-884, out. 2009d.

MORTIMER, S. T. Casa- Practical aspects. **Journal of Andrology**, Durham, v. 21, n. 4, p.515-524, jul/ago.2000.

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

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.

PEÑA, A. I. et al. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, Philadelphia, v.50, n. 1, p.163– 174, jul. 1998.

PESCH, S.; HOFFMANN, B. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. **Journal fur Reproductions medizin Endokrinologie**, Gablitz, v.2, n. 2, p. 101-105, fev. 2007.

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

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. **Theriogenology**, Philadelphia, v.44, n. 6, p.885-900, out.1995.

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, 2003.

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

SILVA A. R.; CARDOSO R. C. S.; SILVA L. D. M. Criopreservação do sêmen canino: revisão. **Ciência animal**, Fortaleza, v. 11, n. 2, p. 119-129, dez.2001.

SILVA, A. E. D. F. et al. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.3, p. 1157-1165, jun. 2002.

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

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

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

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

TSUTSUI, T. et al. Effect of addition of Orvus S paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tokyo, v.62, n.5, p.537-538, maio2000.

UCHOA, D.C. et al. O uso de diferentes diluidores para inseminação artificial com sêmen canino refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL,2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2007. p.182.

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

VASKE, T. R. et al. Seis cães normais nascidos de sêmen congelado. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.1, p.15 – 18, 1981

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

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, Manchester, v.62, n. 1-3, p.23-53, ago. 2000.

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

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, Manchester, v. 60-61, n. 2, p. 60-61, jul.2000.

1 **Artigo: Utilização de sílica coloidal como método de auxílio na seleção espermática para**
2 **criopreservação do sêmen canino**

3 **Colloidal silica as auxiliar method of sperm selection for canine semen cryopreservation**

4 Pieve, H.^{1*}; Neves, J.P.¹; Rosa, A.¹; Saito, T; Bittencour P.S.C¹; Gioso, M.M.¹

5 ¹ Animal Reproduction Laboratory. School of Veterinary Medicine. Unifenas, Alfenas, MG, Brazil.

6 *Correspondência: hugopieve@gmail.com

7 **RESUMO**

8 Objetivou-se comparar as características seminais caninas pós descongelamento de um sêmen
9 previamente centrifugado convencionalmente (grupo controle) e em sílica coloidal. Foram
10 coletados 36 amostras de sêmen de seis cães sadios avaliando a motilidade, vigor,
11 concentração, morfologia e teste hiposmótico. O ejaculado então foi dividido em duas frações
12 iguais, centrifugado por método convencional e pela sílica coloidal e posteriormente
13 criopreservado. O sêmen centrifugado pelos dois procedimentos apresentaram resultados
14 semelhantes ($p < 0,05$), sendo motilidade ($84,72 \pm 8,44$ versus $83,89 \pm 9,93\%$), vigor ($3,97 \pm 0,84$
15 versus $4,19 \pm 0,71$), concentração ($270,71 \pm 109,05$ versus $263,71 \pm 90,50$ espermatozoides/mL),
16 células morfológicamente normais ($93,60 \pm 4,24$ versus $92,97 \pm 4,61\%$) e teste hiposmótico
17 ($90,26 \pm 4,75$ versus $90,53 \pm 4,42\%$) para o grupo controle e sílica coloidal respectivamente.
18 Após o descongelamento as amostras foram examinadas pela análise computadorizada e foi
19 observadas diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos para os valores de Velocidade curvilínea
20 ($63,07 \pm 22,94$ versus $82,29 \pm 27,84 \mu\text{m/s}$), Velocidade linear progressiva ($21,79 \pm 4,60$ versus
21 $26,85 \pm 9,10 \mu\text{m/s}$), Velocidade média da trajetória ($36,39 \pm 9,94$ versus $45,68 \pm 10,16 \mu\text{m/s}$),
22 Linearidade ($37,06 \pm 8,60$ versus $31,68 \pm 9,80\%$) e Retilinearidade ($61,09 \pm 6,48$ versus
23 $56,09 \pm 7,26\%$) para o grupo controle e sílica coloidal respectivamente. Pode-se concluir que a
24 centrifugação pré-congelamento utilizando a sílica coloidal é tão eficaz quanto à
25 centrifugação seminal convencional, podendo ser uma alternativa gerando resultados
26 similares aos demais meios já consagrados na literatura.

27
28 **Palavras-chave:** CASA, coloide, andrologia, centrifugação, Androcoll.

29
30
31
32
33
34

35

36

ABSTRACT

37 This study aimed to compare the canine semen characteristics after thawing of a semen
38 centrifuged conventionally and in colloidal silica. 36 semen samples from six healthy dogs
39 were evaluated about the motility, vigor, concentration, morphology and hyposmotic test. The
40 ejaculate was divided into two equal fractions and centrifuged in colloidal silica and by the
41 conventional method and subsequently cryopreserved. The centrifuged semen presented
42 similar results ($p < 0,05$) between both treatment, like motility ($84,72 \pm 8,44$ vs $83,89 \pm 9,93\%$),
43 vigor ($3,97 \pm 0,84$ vs $4,19 \pm 0,71$), concentration ($270,71 \pm 109,05$ vs $263,71 \pm 90,50$ cels/mL),
44 normal cells ($93,60 \pm 4,24$ vs $92,97 \pm 4,61\%$) and hyposmotic test ($90,26 \pm 4,75$ vs $90,53 \pm 4,42\%$)
45 for the control group and colloidal silica respectively. After thawing the samples from the two
46 experimental groups were examined for computerized analysis parameters and differences
47 ($p < 0,05$) were observed between the groups for the Curvilinear velocity, values ($63,07 \pm 22,94$
48 vs $82,29 \pm 27,84 \mu\text{m/s}$), Progressive linear velocity, ($21,79 \pm 4,60$ vs $26,85 \pm 9,10 \mu\text{m/s}$), Average
49 velocity ($36,39 \pm 9,94$ vs $45,68 \pm 10,16 \mu\text{m/s}$), Linearity ($37,06 \pm 8,60$ vs $31,68 \pm 9,80\%$) and
50 Rectilinearity ($61,09 \pm 6,48$ vs $56,09 \pm 7,26\%$) for the control group and colloidal silica
51 respectively. It can be concluded that pre-freezing centrifugation using colloidal silica is as
52 effective as conventional seminal centrifugation, and may be an alternative generating results
53 similar to those already established in the literature.

54 **Keywords:** CASA, colloide, andrology, centrifugation, Androcoll.

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68 INTRODUÇÃO

69 O Brasil tem papel de destaque no segmento de mercado pet, segundo a Abinpet
70 (2017), ele ocupou a terceira colocação em faturamento no ano de 2016 com 5,14% do
71 faturamento mundial. Dessa maneira, a criação especializada de cães de raça se tornou uma
72 atividade rentável e como consequência houve necessidade de biotécnicas para melhor
73 aproveitamento do material genético de reprodutores caninos.

74 Uma das biotécnicas reprodutivas em destaque é a criopreservação do sêmen que
75 possibilita um melhor aproveitamento de ejaculados oriundos de um mesmo reprodutor, bem
76 como facilita a propagação deste material genético para diferentes regiões do planeta, mesmo
77 após a morte do animal (Silva et al., 2001).

78 Além disso, a utilização do sêmen canino congelado tem a vantagem de permitir a
79 manutenção da capacidade fecundante em animais de alto interesse zootécnico por um espaço
80 indeterminado de tempo, além de resguardá-los do estresse causado pelo transporte para fins
81 de acasalamento (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989).

82 Para amenizar as injúrias provocadas pela ação dos crioprotetores, atualmente, a
83 utilização de coloides em uma única camada para a centrifugação de sêmen (como o
84 Androcoll[®]) tem sido estudada na proposta de melhorar a viabilidade de células espermáticas
85 pré-congelamento e pós-descongelamento, obtendo melhorias nos padrões de qualidade
86 espermática (Dorado et al., 2013).

87 O Androcoll-E[®] (*Minitub[®]*; *Swedish University of Agricultural Sciencesd SLU,*
88 *Uppsala, Sweden*) é o coloide cuja formulação é composta por sílica coloidal revestida por
89 silano e é específico para equinos (Johannisson et al., 2009). Após análises seminais, foi
90 observado que ele promove melhora da qualidade do sêmen equino fresco (Morrell et al.,
91 2009a), congelado (Macias Garcia et al., 2009; Hoogewijs et al, 2011) e resfriado (Morrell et
92 al., 2009d; Bergqvist et al., 2011) com um tempo de preparação menor e processamento
93 menos complicado que o normalmente praticado na centrifugação de gradiente de densidade
94 (Morrell et al., 2009b). Porém, poucos são os relatos destes na espécie canina, sendo
95 largamente utilizado na espécie equina (Hoogewijs et al., 2011).

96 Por esta razão, este trabalho objetivou testar a eficácia da centrifugação seminal em
97 sílica coloidal na proteção e manutenção das características de células espermáticas caninas
98 anteriormente ao processo de congelamento.

99

100

101

102 MATERIAL E MÉTODOS

103 O experimento foi realizado no laboratório de Reprodução Animal da Universidade
104 José do Rosário Vellano, sob a aprovação do parecer nº 49/2015 do Conselho de Ética
105 referente ao Uso de Animais da instituição. Foram selecionados seis cães de raças distintas
106 (Pug, Pastor Alemão, Pastor Branco Suíço, Dogue Alemão, Daschund e Border Collie),
107 sadios, com idade entre 3 a 6 anos, e com características seminais em acordo com os
108 parâmetros estipulados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013)

109 A coleta do sêmen foi realizada através da técnica de manipulação digital do bulbo,
110 selecionando apenas a segunda fração mais turva e rica em espermatozoides (Christiansen,
111 1986), com auxílio de um funil plástico acoplado a um tubo de coleta graduado previamente
112 aquecido a 37°C em placa aquecedora.

113 Após a coleta, a avaliação da motilidade e o vigor foram feitos utilizando microscopia
114 ótica, por um mesmo observador, como estabelecido por Kenney, (1983) em um escore de 0 a
115 100% de acordo com a porcentagem de espermatozoides móveis e de 0 a 5 de acordo com a
116 intensidade da movimentação dos espermatozoides, respectivamente.

117 A concentração espermática (número de espermatozoides/mL) foi realizada diluindo
118 10µL de sêmen em 1000µL de formol salino, dispostos em hemocítmetro e levados para
119 microscopia ótica. Foram contados os espermatozoides presentes nos cinco quadrados
120 diagonais e o número obtido foi multiplicado por cinco milhões para que o resultado fosse
121 dado em número de espermatozoides/ml.

122 Para o teste hiposmótico foram diluídos 10µL de sêmen em 1000µL de água, levados
123 para banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após isso, foram aplicados em hemocítmetro com
124 um período de descanso por 5 minutos e contabilizados 200 espermatozoides. Aqueles que
125 apresentavam a cauda enrolada foram tidos como positivos no teste. (Melo & Henry, 1999).

126 Para a morfologia espermática utilizou-se a preparação úmida com o corante Rosa de
127 bengala, discriminando entre normais e com defeitos maiores e menores, como estabelecido
128 com Blom, (1973).

129 Foram utilizados dois meios diluentes para centrifugação do sêmen, o Androcoll-E® e
130 o CaniPlus Enhance® (*Minitub*®; *Germany*) (grupo controle). Ambos foram preparados na
131 proporção de 1 mL de meio para cada 100×10^6 de espermatozoides já previamente aquecidos
132 em banho maria a 37°C.

133 Para o CaniPlus Enhance[®], o meio foi adicionado lentamente sobre o sêmen,
134 percorrendo a lateral do tubo. Já para o Androcoll-E[®], o tubo contendo o meio foi inclinado a
135 45° e o sêmen foi depositado lentamente sobre este, formando duas fases distintas e por fim,
136 estes foram levados para centrifugação. Para o Androcoll-E[®] a centrifugação ocorreu a 300g
137 por 10 minutos e para o CaniPlus Enhance[®] a centrifugação ocorreu a 700g também por 10
138 minutos, conforme indicação do fabricante para os dois meios. O sêmen foi ressuspensionado em
139 CaniPlus Enhance[®], em quantidade equivalente a do sêmen depositado anteriormente aos
140 meios. Após esse procedimento, foram feitas as análises seminais previamente descritas.

141 Depois, o mesmo foi diluído em CaniPlus Freeze[®](*Minitub[®];Germany*) acrescido com
142 20% de gema de ovo de galinha para alcançar a concentração de 25 milhões de
143 espermatozoides móveis para cada palheta de 0,25 mL. O sêmen diluído foi envasado nas
144 palhetas à temperatura ambiente e posteriormente levado ao refrigerador à temperatura 2 a
145 6°C, onde permaneceu por duas horas. Após a refrigeração, o sêmen foi levado a cinco
146 centímetros do vapor do nitrogênio durante 20 minutos quando finalmente foi colocado em
147 contato com o nitrogênio líquido.

148 Uma semana após o congelamento das palhetas, as amostras foram descongeladas em
149 banho- maria a 37°C por 60 segundos. Para garantir uma quantidade satisfatória de sêmen a
150 ser analisada em cada método, três palhetas de sêmen da mesma partida foram descongeladas.
151 Estas avaliações foram repetidas duas vezes para cada animal. A primeira palheta foi avaliada
152 logo após o descongelamento conforme metodologia descrita abaixo:

153 Uma alíquota de cada amostra foi levada ao aparelho modelo *Sperm Class Analyzer*
154 *SCA 5.0, Micropitc[®]*, Barcelona, Espanha, acoplado a um microscópio de contraste de fase
155 com placa aquecedora (Olympus CX31, Olympus[®], Tokyo, Japão). Os seguintes parâmetros
156 foram registrados: motilidade total, motilidade progressiva, velocidade de trajeto (VAP),
157 velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento
158 lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento da cauda (BCF), retilinearidade (STR) e
159 linearidade (LIN). Para cada parâmetro foi utilizada a média de três campos para a análise
160 estatística. Após a utilização do CASA, foram realizados os testes de morfologia espermática
161 e hiposmótico, via microscopia óptica, conforme anteriormente elucidados.

162 Para análise estatística os dados foram dispostos em planilhas eletrônicas e submetidos às
163 análises de variância e teste de médias a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico
164 SAEG (Ribeiro Junior, 2001).

165

166

167 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

168 Os valores do sêmen fresco são demonstrados na tabela 1. Esses valores demonstraram
 169 que os animais utilizados neste experimento estavam dentro dos padrões exigidos CBRA
 170 (2013) para aptidão de congelamento seminal, onde se pôde observar a motilidade média de
 171 $82,17 \pm 3,67\%$, vigor de $3,63 \pm 2,11$, concentração de $582,20 \pm 166,98 \times 10^6$ sptz/mL, células sem
 172 defeitos morfológicos de $92,65 \pm 3,01\%$ e, por fim, teste hiposmótico de $91,09 \pm 2,24\%$.

173

174 **Tabela 1:** Média \pm desvio padrão da motilidade, vigor, concentração, patologia e teste hiposmótico
 175 (integridade de membrana) do sêmen fresco dos cães utilizados no experimento.

| n | Coletas/animal | Motilidade (%) | Vigor (1-5) | Concentração (sptz/mL) | Morfologia* (%) | Hiposmótico (%) |
|-------|----------------|------------------|-----------------|------------------------|------------------|------------------|
| 1 | 2 | 75 \pm 21,21 | 4 \pm 1,41 | 420 \pm 0 | 91 \pm 2,83 | 91,5 \pm 2,12 |
| 2 | 10 | 84 \pm 6,99 | 3,5 \pm 0,53 | 528,33 \pm 129,83 | 94,5 \pm 2,72 | 92,6 \pm 2,43 |
| 3 | 7 | 84,28 \pm 7,87 | 3,57 \pm 0,53 | 550 \pm 184,84 | 95,67 \pm 2,34 | 90 \pm 3,78 |
| 4 | 4 | 82,5 \pm 5 | 3,75 \pm 0,5 | 900 \pm 432,04 | 88,25 \pm 7,93 | 87,75 \pm 6,13 |
| 5 | 9 | 82,22 \pm 8,33 | 3,44 \pm 0,53 | 601,11 \pm 189,68 | 91 \pm 4,47 | 90,44 \pm 4,39 |
| 6 | 4 | 85 \pm 5,77 | 3,5 \pm 0,57 | 493,75 \pm 119,68 | 95,5 \pm 2,08 | 94,25 \pm 1,71 |
| TOTAL | 36 | 82,17 \pm 3,67 | 3,63 \pm 2,11 | 582,20 \pm 166,98 | 92,65 \pm 3,01 | 91,09 \pm 2,24 |

176 (*) Células íntegras, sem defeitos maiores ou menores, segundo CBRA (2013).

177 Nas tabelas 2 e 3 estão dispostos os dados das variáveis referentes ao sêmen
 178 pós-centrifugação e pós-descongelamento, e evidenciou-se que em ambos os tratamentos não
 179 houve diferença ($p < 0,05$), mostrando que os tratamentos com o Androcoll-E[®] foi tão hábil
 180 para a manutenção de células viáveis para centrifugação e posterior congelamento do sêmen
 181 assim como a centrifugação convencional já utilizada com o CaniPlus Enhance[®].

182 Os valores de análise morfológica e de integridade de membrana são compatíveis com
 183 os apresentados por Gamboa, (2016) que utilizou o Androcoll-E[®] para centrifugação e
 184 resfriamento de sêmen equino das raças Lusitano e Sorraia, porém contrastou com os
 185 resultados de Johannisson et al., (2009), e Pessoa, et al., (2016) que, trabalhando com sêmen
 186 de equinos, notaram que a seleção espermática por Androcoll-E[®] resultou, durante o período
 187 de resfriamento, em maior atividade mitocondrial e viabilidade espermática, apresentando
 188 maior número de células normais.

189 Desta maneira evidenciou-se que a centrifugação utilizando Androcoll-E[®] foi mais
 190 eficiente, assim como os resultados obtidos por Hoogewijs et al., (2011), que selecionaram
 191 uma população de espermatozoides com maior motilidade e integridade de membrana antes
 192 da criopreservação, resultando em maior sobrevivência após o descongelamento.

193 Gamboa (2016) observou que não houve diferença entre a motilidade do sêmen fresco,
194 do sêmen após centrifugação e do sêmen pós-resfriamento do cavalo da raça Sorraia,
195 diferentemente do cavalo Lusitano onde foram apresentadas diferenças significativas
196 ($p < 0.05$), indicando assim que os resultados apresentados podem diferir de acordo com a raça.

197 Trabalhando com a utilização da centrifugação em camada única com Androcoll-C[®]
198 (*Minitub[®]; Swedish University of Agricultural Sciences SLU, Uppsala, Sweden*) (específico
199 para a espécie canina) pré e pós-resfriamento, Gálvez, (2015) concluiu que a centrifugação
200 pós-resfriamento é mais eficiente que a centrifugação pré congelamento ou quando realizada
201 em ambas as situações, porém não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores
202 obtidos da motilidade e morfologia espermática das amostras que foram centrifugadas
203 convencionalmente daquelas que passaram pelo coloide antes do procedimento de
204 refrigeração, assim como os resultados obtidos no atual trabalho com a criopreservação.
205 Porém, houve maior seleção ($p < 0,05$) de células com a membrana plasmática intacta no
206 sêmen tratado com o Androcoll-C[®] em relação ao não tratado, contrariando os resultados
207 apresentados neste trabalho, visto que não houve diferença na integridade de membrana entre
208 os espermatozoides tratados ou não.

209 Os resultados médios de motilidade e vigor após descongelamento foram maiores que
210 os observados por Silva et al., (2000), que trabalharam com várias proporções de glicerol e
211 gema de ovo, passando desde 10 e 20% de gema e 4, 6 e 8% de glicerol em meios a base de
212 água de coco e meios a base de Tris. Ainda comparando com resultados obtidos com
213 congelamento utilizando água de coco, Montezuma Jr et al., (1994) apresentaram resultados
214 semelhantes ao presente trabalho.

215 Os dados de motilidade e vigor obtidos pela análise de sêmen computadorizada
216 assemelham-se aos encontrados por Santos, (2003), embora os dados obtidos no atual trabalho
217 sejam ligeiramente superiores, já que em ambos foram observados redução da motilidade e do
218 vigor espermático após o descongelamento do sêmen criopreservado com meios a base de tris
219 acrescidos de 20% de gema de ovo de galinha, sendo que Santos, (2003) obteve a média de
220 45,5% de espermatozoides móveis e 2 de vigor

221 Os resultados de motilidade após descongelamento demonstrados por Santos et al.,
222 (1999) utilizando Tris foram de $36,75 \pm 20,49\%$ sendo superiores que os meios contendo
223 glicina ($32,30 \pm 8,12\%$), 11% de lactose ($10,27 \pm 6,19\%$), 12% de leite desnatado e 1,2% de
224 glicose, citrato de sódio e fostato ($3,98 \pm 4,52\%$) e citrato ($1,67 \pm 1,65\%$), ainda assim, os dados
225 obtidos nesse presente estudo foram superiores, possivelmente devido à falta de utilização da
226 gema de ovo que não foi utilizada no pré-congelamento do trabalho descrito. Em

227 contrapartida, os resultados obtidos neste experimento ficaram aquém dos encontrados por
 228 Farstad & Andersen-Berg, (1989), Morton & Bruce, (1989), Silva & Versteegen, (1995) e
 229 Chirinéa et al., (2006) que observaram uma motilidade maior que 60% no sêmen
 230 descongelado, utilizando o meio à base de Tris. Dessa forma, mais uma vez fica indicado que
 231 o meio à base de Tris a 6% de crioprotetor e 20% de gema de ovo promove melhores
 232 características das células espermáticas,, independentemente se ocorreu ou não centrifugação
 233 em Androcoll-E®.

234 O sêmen obtido após o descongelamento, segundo Concannon & Batista, (1989) pode
 235 ser utilizado para a inseminação artificial, visto que preconizaram um mínimo de motilidade
 236 de 30% para a realização de tal procedimento. Isto é, mesmo com a queda da motilidade
 237 evidenciada nas amostras pós-descongelamento, o sêmen em ambos os tratamentos pode ser
 238 utilizado para a inseminação artificial, visto que apresentou para CaniPlus Enhance® e
 239 Androcoll-E®, 52,6±18,89 e 47,8±22,47% de células móveis, respectivamente.

240

241 **Tabela 2:** Média ± desvio padrão da motilidade, vigor, concentração, patologia e teste hiposmótico
 242 (integridade de membrana) após a centrifugação do sêmen de seis cães em CaniPlus Enhance® e
 243 Androcoll-E®.

| n | Tratamento | Motilidade (%) | Vigor (1-5) | Concentração (sptz/mL)* | Patologia (%)** | Hiposmótico (%)*** |
|----|------------|----------------|-------------|-------------------------|-----------------|--------------------|
| 36 | Enhance | 83,89±9,93 | 4,19±0,71 | 263,71±90,50 | 92,97±4,61 | 90,53±4,42 |
| 36 | Androcoll | 84,72±8,44 | 3,97±0,84 | 270,71±109,05 | 93,60±4,24 | 90,26±4,75 |
| 72 | TOTAL | 84,04±9,16 | 4,08±0,78 | 267,21±99,54 | 93,28±4,40 | 90,39±4,55 |

244 (*) n=35 para ambos os tratamentos;

245 (***) n=34 e 35 para Enhance e Androcoll, respectivamente;

246 (***) n=35 para Androcoll.

247

248 **Tabela 3:** Média ± desvio padrão da motilidade, vigor, concentração, patologia e teste hiposmótico
 249 (integridade de membrana) após o descongelamento do sêmen de seis cães em CaniPlus Enhance® e
 250 Androcoll-E®

| n | Tratamento | Motilidade (%)* | Vigor (1-5) | Patologia (%)** | Hiposmótico (%) |
|----|------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|
| 36 | Enhance | 52,6±18,89 | 3,11±0,62 | 90,63±5,21 | 75,16±6,84 |
| 36 | Androcoll | 47,8±22,47 | 2,75±0,69 | 90,27±5,37 | 75,55±7,29 |
| 72 | TOTAL | 50,21±20,75 | 2,93±0,68 | 90,45±5,25 | 75,36±7,02 |

251 (*) Valores obtidos através da análise computadorizada de sêmen (CASA)

252 (***) n=33 para ambos os tratamentos.

253

254 Em relação às análises computadorizadas para averiguação dos parâmetros em sêmen
255 de cão, Gálvez, (2015), observou que os valores de VCL ($123,46 \pm 0,56$ vs $127,08 \pm 0,59 \mu\text{m/s}$),
256 VSL ($75,42 \pm 0,46$ vs $82,94 \pm 0,51 \mu\text{m/s}$), VAP ($95,17 \pm 0,50$ vs $101,41 \pm 0,53 \mu\text{m/s}$), eram
257 significativamente maiores ($p < 0,05$) após o processamento com o Androcoll-C[®] quando
258 comparados com as amostras que não passaram pelo tratamento, o que diverge dos dados
259 obtidos e apresentados na tabela 5, onde tais variáveis apresentaram diferença para aquelas
260 amostras que foram centrifugadas com Androcoll-E[®]. Entretanto os valores encontrados para
261 o grupo controle e sílica coloidal, respectivamente, de LIN ($51,43 \pm 0,18$ vs $55,91 \pm 0,20\%$) e
262 STR ($69,52 \pm 0,18$ vs $72,47 \pm 0,20\%$) coincidem com os encontrados.

263 Um decréscimo nos valores da motilidade total ($95,06 \pm 0,01$ vs $78,00 \pm 0,03\%$) e
264 progressiva ($67,44 \pm 0,03$ vs $43,83 \pm 0,03\%$), VCL ($133,71 \pm 4,04$ vs $106,01 \pm 5,96 \mu\text{m/s}$), ALH
265 ($4,36 \pm 0,15$ vs $2,76 \pm 0,15 \mu\text{m}$) e BCF ($7,84 \pm 0,19$ vs $7,09 \pm 0,21 \text{Hz}$) após congelamento
266 utilizando de CaniPRO Freeze[®] ((*Minitub[®]; Germany*) foi notado por Dorado et al., (2013).
267 Após o congelamento, ainda centrifugou o sêmen descongelado com Androcoll-C[®] e obteve
268 como resultados um aumento em motilidade total ($78,00 \pm 0,03$ vs $91,99 \pm 0,01\%$) e progressiva
269 ($43,83 \pm 0,03$ vs $62,27 \pm 0,03\%$), VCL ($106,01 \pm 5,96$ vs $122,24 \pm 5,70 \mu\text{m/mL}$), ALH ($2,76 \pm 0,15$
270 vs $3,58 \pm 0,21 \mu\text{m}$) e BCF ($7,09 \pm 0,21$ vs $8,13 \pm 0,18 \text{Hz}$), notou-se que a variável ALH obteve
271 resultados superiores ($p < 0,05$) entre o sêmen descongelado sem qualquer tratamento e o
272 sêmen descongelado com centrifugação posterior com o Androcoll-C[®]. Ainda observaram
273 uma diminuição no número de células anormais quando o sêmen descongelado foi
274 centrifugado no coloide ($28,47 \pm 8,17\%$) quando comparado com o sêmen descongelado sem
275 nenhum tratamento ($38,75 \pm 6,00\%$), embora mais discretos, este perfil também foi encontrado
276 no atual trabalho um número maior de células sem defeitos morfológicos quando houve a
277 centrifugação com Androcoll-E[®]. Embora exista diferença na metodologia, esses dados são
278 úteis para demonstrar a capacidade da centrifugação em coloides em elevar parâmetros
279 seminais importantes em cães.

280 Trabalhando o congelamento seminal com 20% de gema acrescidos em CaniPlus
281 Freeze[®] após centrifugação convencional do sêmen, Šichtař et al., (2016) obtiveram maiores
282 resultados de VAP ($114,76 \pm 0,45 \mu\text{m/s}$), VCL ($153,81 \pm 0,61 \mu\text{m/s}$), VSL ($108,91 \pm$
283 $0,451 \mu\text{m/s}$), LIN ($67,92 \pm 0,17\%$), STR ($90,46 \pm 0,14\%$), ALH ($7,53 \pm 0,04 \mu\text{m}$) e BCF
284 ($15,69 \pm 0,06 \text{Hz}$) que os obtidos no presente trabalho. Tais valores podem ter sido superiores
285 devido ao meio que foi utilizado para a centrifugação, visto que tanto o CaniPlus Enhance[®] e
286 Androcoll-E[®] são meios que aumentam o metabolismo das células espermáticas devido à
287 maior atividade mitocondrial, o que acarreta em maior prazo um decréscimo nos parâmetros

288 seminais. Além disso, o tempo e a força de centrifugação utilizados por esses pesquisadores
 289 foram menores que o utilizado nesse trabalho (700g por 5 minutos) o que ocasiona menores
 290 danos à essas células.

291 **Tabela 4:** Média \pm desvio padrão dos parâmetros de progressão e velocidade do CASA após o
 292 descongelamento do sêmen centrifugado em CaniPlus Enhance[®] e Androcoll-E[®]

| n | Tratamento | Estáticos (%) | Não progressivos (%) | Progressivos (%) | Rápidos (%) | Médios (%) | Lentos (%) |
|----|------------|-------------------|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| 34 | Enhance | 46,42 \pm 19,28 | 48,18 \pm 19,67 | 5,50 \pm 5,47 | 6,71 \pm 5,48 | 8,74 \pm 5,23 | 39,84 \pm 18,25 |
| 31 | Androcoll | 51,02 \pm 24,26 | 43,21 \pm 22,23 | 5,78 \pm 10,81 | 5,16 \pm 8,23 | 6,15 \pm 6,30 | 37,67 \pm 21,81 |
| 65 | TOTAL | 48,62 \pm 21,75 | 45,81 \pm 20,91 | 5,63 \pm 8,38 | 5,97 \pm 6,92 | 7,50 \pm 6,00 | 38,80 \pm 19,90 |

293

294 Santos, (2016) separou partidas de sêmen bovino por quartis superior e inferior de
 295 acordo com as características espermáticas e notou maiores valores de motilidade total (72,18
 296 \pm 0,76%) e motilidade progressiva (50,45 \pm 1,44%) para sêmen de baixa fertilidade (que
 297 resultou taxas de prenhez \leq 50%) do que de alta fertilidade, onde observou uma motilidade
 298 total de 56,95 \pm 6,54% e motilidade progressiva de 34,85 \pm 0,85%. Concluiu então que os padrões de
 299 qualidade de partidas de sêmen com diferente fertilidade podem apresentar valores semelhantes nas
 300 características seminais avaliadas, além disso, pode haver diferença na qualidade espermática entre as
 301 partidas que não influenciam a fertilidade. Assim, necessita-se de outras análises mais precisas para a
 302 investigação dos fatores causadores de falha na fertilidade em algumas partidas de sêmen.

303 O VCL é fundamental para a formação do reservatório de espermatozoides na junção
 304 útero-tubárica em camundongos (Olds-Clarke, 1996), que VCL e VAP tem papel na
 305 capacidade dos espermatozoides em penetrar o muco cervical (Robayo, 2008) e de fertilidade
 306 do sêmen descongelado de touros (Gillan, 2008) e humanos (Van Den Bergh, 1998). Em
 307 contrapartida, Florez-Rodriguez, (2017), evidenciou maiores valores de VCL, VAP e ALH
 308 em sêmen bovino de baixa fertilidade quando comparado com sêmen de alta fertilidade.
 309 Segundo o autor, estas alterações no padrão de movimento espermático podem indicar o
 310 início da capacitação espermática precoce, o que não é desejado.

311

312

313

314

315

316

317 **Tabela 5:** Média \pm desvio padrão de parâmetros cinéticos obtidos pelo CASA após o
 318 descongelamento do sêmen centrifugado em CaniPlus Enhance[®] e Androcoll-E[®]
 319

| N | Tratamento | VCL ($\mu\text{m/s}$)* | VSL ($\mu\text{m/s}$)* | VAP ($\mu\text{m/s}$)* | LIN (%)* | STR (%)* | ALH (μm) | BCF (Hz) |
|----|------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------|
| 34 | Enhance | 82,29 \pm 27,8 4 ^a | 26,85 \pm 9,10 a | 45,68 \pm 10,16 a | 31,68 \pm 9,80 a | 56,09 \pm 7,26 a | 3,38 \pm 1,17 | 6,75 \pm 3,56 |
| 31 | Androcoll | 63,07 \pm 22,9 4 ^b | 21,79 \pm 4,60 b | 36,39 \pm 9,94 ^b | 37,06 \pm 8,60 b | 61,09 \pm 6,48 b | 3,04 \pm 1,30 | 7,14 \pm 4,93 |
| 65 | TOTAL | 73,13 \pm 27,2 0 | 24,43 \pm 7,69 | 41,18 \pm 11,02 | 34,29 \pm 9,55 | 58,51 \pm 7,29 | 3,29 \pm 1,23 | 6,94 \pm 4,24 |

320 (*) Dados na mesma coluna diferem por ANOVA (P<0,05)

321 VCL = Velocidade Curvilínea; VSL = Velocidade Linear Progressiva; VAP = Velocidade Média de
 322 Trajetória; ALH = Amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF = Frequência de batimento
 323 flagelar cruzado; STR = Retilinearidade e LIN = Linearidade.

324 CONCLUSÃO

325 Pode-se concluir que a centrifugação pré-congelamento utilizando a sílica coloidal é
 326 tão eficaz quanto a centrifugação seminal convencional, podendo ser uma alternativa, gerando
 327 resultados similares aos demais meios já consagrados na literatura.

328

329 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

330

331 ABINPET – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação.
 332 Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado/>>. Acessado dia 30 maio. 2017.

333

334 BERGQVIST, A. S. et al. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa through
 335 Androcoll-E does not adversely affect their capacitation-like status, as measured by CTC
 336 staining. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, n. 1, p. 74-78, 2011.

337

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

340

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

343

- 344 CHIRINÉA, V. H.; MARTINS, M. I. M.; SOUZA, F. F.; et al. Características
345 morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios
346 diluentes. *Ciência Animal Brasileira*, v.7, p.407-415, 2006.
- 347
- 348 CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination.
349 In: Kirk RW. (Ed.). *Current veterinary therapy*. Philadelphia: WB Saunders, 1989. p.1247-
350 1259.
- 351
- 352 CHRISTIANSEN, I.J. (Ed). *Reprodução no cão e no gato*. São Paulo: Manole, 1986. 363p.
- 353
- 354 DORADO, J.; GÁLVEZ, M. J.; MORRELL, J. M. et al. Use of single-layer centrifugation
355 with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, v.
356 80, p. 955-962, 2013.
- 357
- 358 FARSTAD, W.; ANDERSEN-BERG, K. Factors influencing the success rate of artificial
359 insemination with frozen semen in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility*, n.39,
360 p.289-292, 1989. Suplemento.
- 361
- 362 FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; ARRUDA, R.P.; BIANCHI-ALVES, M. R. et al.
363 Morphofunctional characterization of cooled sperm with different extenders to use in equine-
364 assisted reproduction. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.34, p.911-917, 2014.
- 365
- 366 GÁLVEZ, M. J.; ORTI, Z. I.; HIDALGO, M. et al. Should single layer centrifugation of dog
367 semen be done before or after the semen is cooled? *Veterinary Record*, v. 176, n.359, p. 1-6,
368 2015.
- 369
- 370 GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W. M. et al. Assessment of in vitro sperm
371 characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*, Manchester,
372 v. 103, n. 3-4, p. 201-214, 2008.
- 373
- 374 GAMBOA, S.; QUARESMA, A.; CASTRO, F. et al. In vivo fertilizing ability of stallion
375 spermatozoa processed by single layer centrifugation with Androcoll-E™. *Saudi Journal of*
376 *Biological Sciences*, v. 24, n.7, p. 1489-1496, 2016.
- 377

- 378 HOOGEWIJS, M.; MORRELL, J.; VAN SOOM, A.; S. et al. Sperm selection using single
379 layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions.
380 *Equine Veterinary Journal*, v. 40, p. 35-41, 2011.Suplemento.
381
- 382 JOHANNISSON, A.; MORRELL, J. M.; THOREN, J. et al. Colloidal centrifugation with
383 Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal*
384 *Reproduction Science*, v. 116, p. 119-128, 2009.
385
- 386 KENNEY, R. M.; HURTGEN, J. P.; PIERSON, R. et al. Society for theriogenology manual
387 for clinical fertility evaluation of stallion. *Theriogenology*, v. 1, p.100, 1983.
388
- 389 LINDE – FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and
390 the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and*
391 *Fertility*, v. 39, p.299 – 310, 1989.
392
- 393 MACIAS GARCIA, B.; MORRELL, J. M.; ORTEGA FERRUSOLA, C. et al.
394 Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-
395 thawed stallion semen. *Animal Reproduction Science*. v. 114, p. 193-202, 2009.
396
- 397 MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arquivo*
398 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 71-78, 1999.
399
- 400 MONTEZUMA JÚNIOR, P. A.; VIANA NETO, R.; NUNES, J. F. Utilização da água de
401 coco in natura com adição de gema de ovo como diluente de congelação do sêmen canino, em
402 pailietes de 0,5mL. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23.,
403 1994, Olinda-Pe. *Anais...* Olinda, PE: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994.
404 p.535.
405
- 406 MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; STRUTZ, H. et al. Colloidal centrifugation of
407 stallion semen: changes in sperm motility, velocity and chromatin integrity during storage.
408 *Journal of Equine Veterinary Science*, v.29, p. 24-32, 2009a.
409
- 410 MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Biometric techniques for improving
411 sperm quality in animal breeding: A review. *The Open Andrology Journal*, v. 1, p. 1-9, 2009b.

412

413 MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A. M. et al. Single Layer Centrifugation
414 with Androcoll™-E can be scaled-up to allow large volumes of stallion ejaculate to be
415 processed easily. *Theriogenology*, v.72, p. 879-884, 2009d.

416

417 MORTON, D. B.; BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to
418 the use of frozen semen in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.39, p.311-316,
419 1989.

420

421 OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? *Journal of*
422 *Andrology*, v.17, n.3, p.183-186, 1996.

423

424 PESSOA, G. A. Separação espermática pré refrigeração do sêmen equino. 2016. 100 f. Tese
425 (Doutorado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

426

427 RIBEIRO JÚNIOR, J.I. *Análises estatísticas no SAEG*. Viçosa: UFV, 2001. 301p.

428

429 ROBAYO I, MONTENEGRO V, VALDÉS C, COX JF. CASA assessment of kinematic
430 parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant
431 cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, p.393-399, 2008.

432

433 SANTOS, FB. Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de
434 corte. 2016. 62f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
435 Universidade de São Paulo, São Paulo.

436

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

441

442 SANTOS, S; VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S. et al. Comparação entre cinco diluidores
443 na congelação de sêmen de cães. *Brazilian Journal of Veterinary Reproduction Animal*
444 *Science*, v. 36, p. 244-249, 1999.

445

- 446 ŠICHTAŘ J.; ŠIMONÍK O.; FOLKOVÁ P. et al. The quality of frozen-thawed canine semen
447 with respect to semen extender composition and sequence of ejaculate collection in dogs. *Acta*
448 *Universitatis Agriculturae Et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, v. 64, p. 169-175, 2016.
449
- 450 SILVA A. R.; CARDOSO R. C. S.; SILVA L. D. M. Criopreservação do sêmen canino:
451 revisão. *Ciência animal*, v. 11, p. 119-129, 2001.
452
- 453 SILVA A. R.; CARDOSO R. C. S.; SILVA L. D. M. Congelação de sêmen canino com
454 diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de
455 coco. *Ciência Rural*, v.6, p.1021-1025, 2000.
456
- 457 SILVA, L. D. M.; VERSTEGEN, J. P. Comparisons between three different extenders for
458 canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v.44,
459 p.571-579, 1995.
460
- 461 VAN DEN BERGH, M. ; EMILIANI, S.; BIRAMANE, J. et al. A first prospective study of
462 the individual straight line velocity of the spermatozoon and its influences on the fertilization
463 rate after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, v. 13, p. 3103– 3107, 1998.
464

ANEXO

Normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. ISSN 0102-0935 *versão impressa* e ISSN 1678-4162 *versão online*

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.

- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia do Certificado de aprovação do projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. Esclarecemos que o referido documento deve constar como sendo a primeira página do texto em Word (não incluir no texto em pdf), além da menção, em Material e Métodos, do número do Certificado de aprovação do projeto.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto **não** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser

indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação;
2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco.

Introdução: Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do CEUA (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Figura: Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve

figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **sem** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, adaptadas para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação: Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já **citada por** outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal: Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como "Desistência do Autor" artigos em diligência e/ou "Aguardando liberação do autor", que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$50,00 (cinquenta reais) deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$150,00, por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor

informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.