

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITO DA CURVA DE REFRIGERAÇÃO NA QUALIDADE DO SÊMEN CANINO

MARIANA GOBBATO NEULS

PORTO ALEGRE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITO DA CURVA DE REFRIGERAÇÃO NA QUALIDADE DO SÊMEN CANINO

MARIANA GOBBATO NEULS

Médico Veterinário

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Biotécnicas de
Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory

PORTO ALEGRE

2007

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho somente foi possível graças à colaboração de muitas pessoas, agradeço de coração a todas elas que de alguma forma colaboraram para sua realização e conclusão.

Ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade da realização do trabalho

Ao Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory, professor, orientador e amigo, por toda sua dedicação, paciência, a grande ajuda para que este trabalho fosse realizado e concluído.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Mattos, por todas suas explicações e orientações durante todo o processo.

A Dra. Marianne Gregory que muito ajudou em todo o experimento, dedicou seu finais de semana do verão para que tudo ocorresse de forma adequada, e me motivou para que o trabalho fosse feito e concluído

A aluna Joana Gregory por toda ajuda e explicações antes e durante o experimento.

Ao Dr. Alexandre Craveiro, que deu todo suporte emocional, e trabalhou muito em nossa clínica para compensar meus períodos de ausência.

A toda equipe da Fertivida Clínica Veterinária, pelo trabalho extra durante a minha ausência, e por agüentar todo meu mau humor durante o transcorrer do processo até sua conclusão

A todas as pessoas do REPROLAB, pela ajuda e suporte, especialmente aos alunos Gabriel Monteiro Davolli e Giovanni Casanova Camozzato, sua colaboração foi fundamental para que o experimento se realizasse. E ao Andrei Beskow pela ajuda com o diluente e organização do material.

A amiga Amy Downing e ao Dr. Helio Autran de Moraes que colaboraram para que o artigo fosse escrito na língua inglesa

Ao amado Alexandre Tarso que ajudou e ficou ao meu lado durante todo o processo de finalização por sua paciência e compreensão

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e torceram por mim em mais esta etapa da minha vida

Ao canil Infinitus Kennel, sua proprietária e seus funcionários que disponibilizaram seu tempo e cães para que o experimento fosse realizado

Principalmente aos cães que foram usados, afinal sem a tolerância das fêmeas utilizadas como "teaser" para as coletas e aos machos que tanto colaboraram para que o tudo fosse realizado de forma correta e ágil, este trabalho não passaria de um projeto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	Inseminação artificial	7
2.1.1	Inseminação artificial com sêmen in natura	8
2.1.2	Inseminação artificial com sêmen resfriado	9
2.2	Avaliação do sêmen canino	10
2.2.1	Motilidade espermática e Vigor	11
2.2.2	Concentração	12
2.2.3	Morfologia	12
2.2.4	Funcionabilidade de membrana	12
2.2.5	Integridade de membrana	13
2.3	Diluidores para resfriamento de sêmen	14
2.4	Resfriamento do sêmen canino	16
3	ARTIGO	18
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

|

LISTA DE ABREVIATURAS

AKC – American Kennel Club

ATP – Trifosfato de Adenosina

CFDA – Corantes de Acetato de 6-carboxifluoresceína

ICSB – International Canine Sêmen Bank

Kg - Kilograma

LH – Hormônio Luteinizante

LIN – Linearidade do Movimento dos Espermatozóides VAP – Padrão Médio de Velocidade Espermática

ml - Mililitros

mOsm - miliosmol

ng - nanograma

pH - potencial de hidrogênio

PI – Iodeto de Propídio

STR – Sobreposição de Deslocamento Retilíneo e do Deslocamento Curvilíneo

VSL – Velocidade de Deslocamento em Linha Reta

VCL – Velocidade de Deslocamento Curvilíneo

TRIS - Trhidroxiaminometano

LISTA DE TABELAS

Table 1: Average value (Average) and stander deviation (E.D.) found 5 collections of the dogs for each of the evaluated parameters25

Table 2: Percentage of motility and vigor of the chilled semen using slow chilling curve at different evaluated times......25

Table 3: Percentage of motility and vigor of the chilled semen using fast chilling curve at different evaluated times25

Table 4: Percentage of function membrane (HOST) and plasma membrane integrity (PIM) of the chilled semen in slow chilling rate at the different evaluated times26

1. Introdução

A seleção dos padreadores a serem utilizados na cinofilia vem se aprimorando cada vez mais. A dimensão do Brasil gera custos muito altos para transportar os cães destinados à reprodução.

Uma técnica de reprodução assistida largamente utilizada é a inseminação artificial com sêmen “*in natura*”, quando o macho e a fêmea encontram-se no mesmo local. Nos casos em que a fêmea e o macho encontram-se em lugares distantes, o emprego do sêmen resfriado a 5° C permite o armazenamento e transporte de células espermáticas, reduzindo custos e evitando o deslocamento dos animais (ROTA et al, 1995; CUNHA 1997; MAGNAGO, 2000).

Apesar de suas vantagens a refrigeração apresenta limitações no que diz respeito à viabilidade espermática pois, em baixas temperaturas e em longos períodos de tempo, o espermatozóide sofre perdas metabólicas e lesões que diminuem sua capacidade de fecundação (CUNHA, 1997).

Estudos aprimorados das técnicas de preservação do sêmen canino são fundamentais, principalmente no que diz respeito ao diluente e velocidade de resfriamento que minimizem lesões na membrana espermática e mantenham uma boa motilidade dos espermatozoides.

Este estudo objetivou avaliar o efeito de um diluente submetido a duas diferentes curvas de resfriamento, sobre as características morfofisiológicas do sêmen resfriado por até 48horas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Inseminação artificial

A primeira inseminação artificial com sêmen fresco na espécie canina, foi relatada em 1780 por Spallanzani, resultando no nascimento de três filhotes vivos (MIES FILHO, 1987).

A inseminação artificial na espécie canina com sêmen fresco é a técnica mais utilizada em substituição à monta natural, especialmente em casos onde a monta não é possível devido a fatores comportamentais, físicos, sanitários e até mesmo geográficos.

Na década de 50, uma gestação decorrente de inseminação artificial com sêmen canino preservado em leite pasteurizado e refrigerado por sete dias foi descrita por Harrop (1956).

Atualmente, a forma mais empregada de inseminação artificial em cães é feita com sêmen in natura (FELDMAN e NELSON, 1996), entretanto outras formas também empregadas são a inseminação com sêmen refrigerado, ou congelado.

A partir de 1986, o American Kennel Club (AKC) começou a registrar ninhadas oriundas de acasalamentos através de inseminação com sêmen refrigerado.

2.1.1 Inseminação artificial com sêmen in natura

A inseminação artificial com sêmen in natura é a forma mais empregada em cães e é feita por inúmeras razões, mais comumente, devido à inabilidade do macho ou da fêmea de efetuar a monta natural. Nas fêmeas encontramos restrições vaginais, defeitos de conformação, afecções de membros posteriores, problemas psicológicos e dor. No macho, devido afecções gerais, artrites, dores na coluna, ejaculação precoce e defeitos de conformação que impeçam a penetração e formação do “nó” para um acasalamento natural. A inseminação também é escolhida quando existe diferença de tamanho muito grande entre os animais. De acordo com Feldman e Nelson (1996) este tipo de inseminação quando realizada de forma e momento adequado, alcança índices de concepção entre 75 a 80%.

O sêmen canino utilizado in natura deve ser imediatamente introduzido no trato genital feminino através de uma pipeta apropriada, sendo sua deposição feita no fundo vaginal (CHRISTIANSEN, 1988). A dose inseminante de sêmen “in natura”, necessária para se obter bons índices de prenhez varia de 150 a 200 milhões de espermatozoides, num volume compatível com o tamanho da fêmea, variando entre 1,0-30,0 mL (LINDEFORSBERG ET AL.,1999).

2.1.2 Inseminação artificial com sêmen resfriado

O uso de sêmen resfriado é também indicado quando o macho está geograficamente distante da fêmea a ser acasalada.

O resfriamento é um processo de preservação do sêmen a baixa temperatura, em torno de 4° C, durante um tempo determinado (FELDMAN e NELSON, 1996; CHRISTIANSEN, 1988; LINDE-FORSBERG et al., 1995).

O diluente é adicionado ao sêmen com a função de proteger a membrana celular do espermatozóide e evitar lesões durante todo processo, e protegendo assim, dos danos físicos que possam ocorrer durante o transporte do material inseminante. Outras funções do diluente são provimento de nutrientes, bem como auxiliar na manutenção do pH do meio (LINDE-FORSBERG, 1991).

Os diluentes mais utilizados para resfriamento do sêmen canino, são: Tris-gema, Citrato-gema, leite desnatado, citrato-bicarbonato-gema e leite (CONCANNON e BATTISTA, 1989). Atualmente, nos Estados Unidos, são muito usados os diluentes comerciais como: *Synbiotics*, *Camelot Farms*, *International Canine Sêmen Bank-ICSB*.

A diminuição da temperatura provoca muitas alterações biológicas podendo os espermatozóides sofrer com o choque térmico, afetando os padrões de motilidade, membrana plasmática e acrossoma (JASKO, 1994). Já estudos realizados por Kumi-Diaka e Badtram em 1994, não evidenciaram nenhuma alteração significativa da membrana espermática em sêmen canino refrigerado. Para otimizar o índice de concepção, England e Ponzio (1996) indicam que é melhor que o sêmen refrigerado canino seja usado em um período de até 48hs após a coleta.

Geralmente, o sêmen canino é diluído na proporção de 1 parte de sêmen para 2 a 3 partes de diluente (HELD 1997).

Muitos fatores estão envolvidos no sucesso da inseminação artificial com sêmen refrigerado, incluindo a coleta do sêmen, refrigeração adequada, determinação do momento da ovulação e uma técnica apropriada de inseminação artificial.

O fracionamento no ejaculado do cão foi primeiramente descrito por Freiberg (1935), onde a segunda fração foi reconhecida como a fração espermática ou rica.

A primeira fração (pré-espermática) é de aspecto aquoso com pH entre 6,2-6,5 e volume entre 0,4 - 18mL e ocorre até os dois primeiros minutos da ejaculação (JOHNSTON, 1991). Na seqüência, com duração de 30 a 60 segundos, é liberada a

segunda fração espermática de aspecto cremoso com pH entre 6,3 - 6,6 e volume de 0,5 a 3,5 mL (GUNZEL-APEL, 1994). A última fração é de origem prostática e apresenta um aspecto aquoso, sua liberação dura de 10 a 75 minutos com pH entre 6,5 - 7,0 e o volume desta fração está entre 1,0 – 15,0 mL (AGUIAR, 1994). No uso do sêmen resfriado, deve-se fazer a coleta do sêmen realizando-se a separação das fases, coletando somente a segunda fração, à qual será adicionada o diluente.

O ciclo estral canino é muito longo e variável entre as diferentes fêmeas, a detecção do melhor momento para cobertura, ou inseminação artificial é um importante fator para se obter bons índices de fertilização.

A monitorização do nível de progesterona sérica é o método de eleição para detecção da ovulação canina (LINDE-FORSBERG, 1995 ; FELDMAN e NELSON, 1996). Os níveis basais de progesterona vão de 0- 1,2 ng/mL de soro no anestro. No proestro, estes níveis situam-se em torno de 4,5 ng/mL de soro. No momento do pico de LH, o nível de progesterona é de 1-2,5 ng/mL de soro, porém estes valores diferem entre cada indivíduo, e continuam a aumentar até a ovulação que ocorre quando são detectados no soro valores em torno de 5 ng/mL. Estes valores permanecem elevados durante o diestro, quando os níveis podem chegar a 80 ng/mL de soro.

Após detectada a ovulação, a fêmea pode ser inseminada utilizando-se a técnica de deposição vaginal do sêmen. Após a inseminação, os membros posteriores da fêmea devem permanecer elevados por 5 minutos, para facilitar o transporte do sêmen até o oviduto (LINDE-FORSBERG, 1995).

Foote & Leonard (1964) citam como tempo máximo para o armazenamento do sêmen canino o período de 13 dias.

2.2 Avaliação do Sêmen Canino

O objetivo da avaliação seminal é de conhecer a capacidade fecundante do sêmen, relacionado-a ao número de células estrutural e funcionalmente normais (WATSON 1990 e PEÑA, 1998).

São descritos inúmeros testes funcionais e estruturais para avaliação do sêmen (AMANN, 1989; ENGLAND e ALLEN, 1992; CUNHA et al, 1996; HEWITT e ENLAND, 1998), porém nenhum teste ou avaliação isolada é capaz de provar seguramente

a capacidade fecundante de um ejaculado (AMANN 1989; PENA, 1997). A melhor maneira de avaliar a fertilidade seria uma inseminação artificial resultando em gestação.

2.2.1 Motilidade Espermática e Vigor

A motilidade espermática é uma das principais características a ser levada em consideração na avaliação do sêmen, sendo necessária ao espermatozóide para fertilização. Segundo Picket (1993), existe uma forte correlação entre motilidade e capacidade fecundante do espermatozóide.

A exame da motilidade espermática deve ser feita dentro de alguns minutos após a coleta, pois o tempo e a temperatura podem influenciá-la, assim como o local de armazenamento do sêmen, ou o contato com produtos químicos (ENGLAND e ALLEN, 1992). A avaliação pode ser feita de forma subjetiva, utilizando um microscópio óptico, ou por programas de computador.

Os movimentos dos espermatozóides não obedecem a um tipo único: há elementos que se deslocam para frente em linha reta (movimento progressivo), enquanto outros descrevem uma circunferência (movimento circular) e finalmente, outros se limitam a oscilar no campo microscópico (movimento oscilatório) (KENNEY et al., 1983; MIES FILHO, 1987). O parâmetro que mede estes movimentos chama-se vigor espermático, referido como a qualidade de motilidade exibida pelos espermatozóides móveis e observada numa escala de 0 a 5. Presença de vigor 0 indica imobilidade dos espermatozóides, e vigor 5 sugere rápida mobilidade através do campo. Cães normais devem apresentar vigor dos espermatozóides superior a 3 (progressão moderada para a frente) (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998). O vigor é a qualidade da motilidade (SILVA et al., 2002)

A motilidade progressiva é o movimento normal esperado no espermatozóide e segundo Pickett e Voss (1972) esta avaliação é a mais precisa, visto que estes espermatozóides representam a maior capacidade fertilizante.

O valoração da motilidade é baseada em uma escala percentual, um sêmen de boa qualidade apresenta motilidade maior ou igual a 70% (Feldmann e Nelson, 1996)

2.2.2 Concentração

A concentração espermática nos cães varia conforme idade, raça, manejo reprodutivo e técnica de coleta, assim como o tamanho do animal e seu volume testicular e prostático (JOHNSTON, 1991). A concentração espermática nos cães pode variar de 200 milhões a 10 bilhões de espermatozóides no volume total do ejaculado, porém o valor médio é de 500 milhões de espermatozóides (JOHNSTON, 1991; FELDMAN e NELSON, 1996; SILVA et al., 2003; THEREFALL, 2003).

2.2.3 Morfologia

Na espécie canina uma amostra de sêmen para ser considerada normal, quanto à morfologia espermática, deve ter a proporção de defeitos primários e secundários de no máximo 30%, sendo que a percentagem de defeitos primários não deve ultrapassar 10% (CBRA, 1998; THEREFALL, 2003). Acredita-se que a morfologia espermática se correlacione com a fertilidade in vivo mais do que qualquer outro parâmetro de avaliação seminal (RENTON et al., 1986; OETTLÉ, 1993; FELDMAN e NELSON, 1996).

2.2.4 Funcionalidade da Membrana

A membrana plasmática do espermatozóide está envolvida em trocas metabólicas com o meio, e o estudo da sua funcionabilidade soma-se aos parâmetros tradicionais de avaliação seminal para determinar índices de fertilidade (LAGARES, 1995; KOHNE et al., 1995). Uma característica da membrana das células espermáticas é sua capacidade de transporte seletivo de moléculas, sendo esse transporte um processo essencial para a viabilidade e capacidade fertilizante do espermatozóide, exigindo-se que essa membrana apresente-se íntegra para ser funcional (KUMI-DIAKA, 1993).

Os espermatozóides podem ser submetidos ao teste hiposmótico (HOST) que avalia a funcionalidade da membrana. Quando a célula é exposta à condição hiposmótica, a água penetra no interior da célula para atingir o equilíbrio osmótico. Esse influxo de água aumenta o volume da célula e a membrana plasmática se dobra, sendo esta curvatura

observada na cauda do espermatozóide que fica enrolada. Para England - Plummer (1993), o teste hiposmótico pode ser utilizado com segurança para diagnosticar funcionalidade da membrana espermática no sêmen de cães.

Fraser (1984) observa uma alta correlação entre o teste hiposmótico, motilidade espermática e reação do acrossomo, o que pode aumentar de forma significativa a previsão da capacidade fertilizante do espermatozóide. As membranas devem estar intactas e funcionais para manter os componentes intracelulares necessários para a penetração e fertilização do óvulo.

2.2.5 Integridade de Membrana

Para avaliação de integridade de membrana (IME), que pode sofrer danos quando submetida a baixas temperaturas, diferentes métodos podem ser empregados, (OETTLÉ - SOLEY, 1988).

Garner et al. (1986) e Cunha (1997) descreveram a utilização de fluorescência para esta avaliação. Para isto empregaram uma combinação dos corantes diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI). Estas colorações avaliam a presença de rupturas como resultado da morte espermática, onde a membrana pode estar fisicamente intacta, mas quimicamente inativa (KUMI-DIAKA e BADTRAM, 1994). Segundo Johnson et al. (1996) o CFDA fluoresce em verde as células com membrana íntegra e o PI fluoresce em vermelho nas células com membrana alterada.

A observação em microscópio de epifluorescência indica as células com membrana íntegra em coloração verde fluorescente e as células com membrana lesadas coradas com vermelho ou vermelho e verde (SOUZA, 2003).

A importância de se avaliar a integridade estrutural de células espermáticas deve-se ao fato de que a funcionalidade do gameta está diretamente ligada a integridade da membrana plasmática, ou seja, para toda lesão estrutural tem-se uma alteração funcional correspondente (ZUCCARI, 1998).

Quando os espermatozoides são submetidos a baixas temperaturas ocorre um choque térmico, que é o conjunto de alterações espermáticas com redução de suas habilidades e redução de sua motilidade e viabilidade (PICKETT e KOMAREK, 1967). Para Farstad (1996) as principais alterações físico-químicas que as membranas celulares

sofrem durante o resfriamento são: diminuição da fluidez e aumento na permeabilidade da membrana; danos ao acrossoma; liberação de enzimas e fosfolipídios; redução na atividade metabólica e redução no consumo de ATP; podendo estas conseqüências serem irreversíveis, comprometendo parcial ou totalmente a fertilidade.

Watson & Plumer (1987) observaram, em microscopia eletrônica, que a membrana plasmática é a primeira estrutura a sofrer injúrias com o resfriamento, evidenciando mudanças em sua organização e composição lipídica com a movimentação lateral dos fosfolipídios tornando-se mais restrita, exibindo uma transição da fase fluida para gel, com formação de arranjos hexagonais (WATSON, 1996). Como resultado desta reorganização dos lipídeos há uma alteração na permeabilidade da membrana (DOBRINSKI et al., 1993) afetando toda sua fluidez, com alteração nas concentrações iônicas intra e extracelulares (WATSON, 1996) comprometendo a bomba de sódio e potássio (AMANN e PICKETT, 1987).

O choque térmico é evidenciado microscopicamente pela presença de espermatozóides com movimentos circulares e perda prematura da motilidade (AMANN e PICKETT, 1987). Segundo Quinn & White (1966), esta perda é conseqüência do decréscimo de oxigênio e ATP, reduzindo a produção e fornecimento de energia para a movimentação do espermatozóide.

Danos causados ao espermatozóide variam com a espécie, taxa de diluição, curva de resfriamento, temperatura e período de armazenamento (PICKETT e KOMAREK, 1967). O espermatozóide do cão é mais resistente ao choque térmico que o de bovino, ovino e suíno (BOUCHARD *et al.*, 1990). No entanto, a resistência ao choque térmico pode variar dentro de uma mesma espécie (PURSEL *et al.*, 1973), e também entre ejaculados do mesmo animal (MAGNAGO, 2000).

2.3 Diluentes para resfriamento de sêmen

Há grande variedade de meios diluentes para resfriamento de sêmen canino. Os diluentes propiciam ao espermatozóide suporte nutritivo e proteção durante o resfriamento, diminuindo os efeitos causados pelo choque térmico (NELSON e COUTO, 1994) e prolongando sua vida (BRINSKO e VARNER, 1992). Os diluidores não agem somente

conservando o sêmen, mas também são utilizados para aumentar seu volume (MIES FILHO, 1987) e auxiliar nas avaliações das amostras de sêmen (KENNEY et al., 1983).

Foote (1964) e Foote & Leonard (1964) foram os primeiros pesquisadores a investigar sistematicamente a combinação de quantidades de vários componentes dos diluentes para preservação do sêmen canino.

De acordo com Concannon e Battista (1989) o meio diluente deve apresentar tampões que impeçam as mudanças nocivas de pH, substâncias protetoras contra choque térmico durante o resfriamento, nutrientes usados como fonte de energia, prevenção no crescimento de bactérias, pressão osmótica fisiológica além de concentração de eletrólitos adequada.

O pH do sêmen canino varia entre 6,0 e 8,0. Segundo Concannon (1991), o espermatozóide do cão tolera um pH entre 5,0 e 10,0, sendo que o pH de 6,6 é ideal (BUSH, 1991). Entretanto, England (1993) obteve motilidade espermática que considerou satisfatória durante o período de incubação em um experimento com valor do pH em 7,3.

A atividade metabólica do espermatozóide resulta num acúmulo de íons de hidrogênio, sendo assim a utilização de uma solução tampão no diluente é necessária para neutralizar um pH ácido do meio e evitar a diminuição da motilidade espermática progressiva.

Foote (1964) e Foote & Leonard (1964) examinaram os efeitos de diferentes tampões (citrato, fosfato e glicina) e a percentagem da gema de ovo no pH do sêmen canino armazenado a 4° C e concluíram que a melhor combinação para preservação da motilidade espermática foi usando 20% de gema de ovo, 1,16% de citrato de sódio a 2,94%, 0,75% de glicina, 1% de glicose e pH de 6,6.

A osmolaridade do sêmen canino é de 300 mOsm/Kg (PICKET et al., 1976), cujo valor em diluentes a serem utilizados, deve ser semelhante (BUSH 1991). Entretanto, Varner et al. (1989) considera ideal um diluente com 350 mOSm/Kg.

Como substância protetora ao choque térmico, a mais comumente utilizada é a gema de ovo. (DOBRINS ET AL., 1993).

Como fonte de energia são usados os açúcares que funcionam como substrato energético exógeno, como componentes osmóticos e como agentes crioprotetores (WATSON, 1979).

Apesar do ejaculado ser estéril, sua contaminação a partir da uretra, pênis e prepúcio é inevitável durante a colheita do sêmen, podendo ser diminuída com boas

medidas de higiene. Esta contaminação pode afetar negativamente a fertilidade, pela própria presença das bactérias, pela produção de toxinas, por degradação dos componentes do meio e pela utilização de substratos metabólicos, determinando desta maneira a necessidade de incorporar aos diluentes substâncias de efeito antimicrobiano (WATSON, 1990). A utilização de Penicilina e Estreptomicina resulta numa preparação antibiótica eficaz e possivelmente a mais utilizada na elaboração de diluentes seminais (WATSON, 1979).

Muitos diluentes utilizados em outras espécies vêm sendo adaptados e analisados em espermatozoides de cães. Estes diluentes são compostos geralmente por tris, citrato, leite, açúcares, gema de ovo e glicerol (GILL et al., 1970; SEAGER e FLETCHER, 1972; PROVINCE et al., 1984; LINDE FORSBERG, 1991; ROTA et al., 1995; MAGNAGO, 2000). A análise dos resultados de cada diluidor geralmente é realizada em laboratório, avaliando-se a motilidade e integridade das membranas. Rota et al., em 1995, concluíram que, apesar da melhor forma de se avaliar um diluente seja através da taxa de concepção após a inseminação artificial, em condições experimentais, esta prática não é utilizada em cães.

2.4 Resfriamento do sêmen canino

Em comparação a outras espécies poucas pesquisas foram realizados na espécie canina no sentido de avaliar os efeitos da velocidade de resfriamento do sêmen até a temperatura de estocagem e transporte a + 4 °C. Ao avaliar o resfriamento de sêmen canino a 4°C e comparando diferentes diluentes Rota et al (1995) não informam, porém a taxa de abaixamento da temperatura utilizada no experimento.

Olar et al (1989) congelando sêmen canino com diferentes diluentes avaliaram a velocidade de resfriamento pré-congelamento (período de equilíbrio). Concluem que o sêmen canino suporta variações na curva de resfriamento durante o período de equilíbrio sem afetar a fertilidade pós-congelação.

Com o objetivo de avaliar diferentes velocidades de resfriamento de sêmen equino diluído sobre a motilidade, Varner et al (1988) verificaram bons resultados quando o abaixamento da temperatura se dava a um gradiente de -0,3°C por minutos. Velocidades entre -0,9°C a -1,3°C por minuto apresentam efeitos deletérios na qualidade do ejaculado, resultando em decréscimo significativo na motilidade espermática.

Na espécie eqüina, Sieme (2005) refere que uma curva de resfriamento de sêmen diluído entre -0,05 a -0,1 °C por minuto seria a ideal. Entretanto para uso prático, o período de tempo se torna demasiado lento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de um diluente (tris-gema) submetido a duas diferentes curvas de resfriamento, comparando as características morfofisiológicas do sêmen resfriado até 48 horas.

3. ARTIGO

EFFECTS OF REFRIGERATION CURVE ON CANINE SEMEN QUALITY

Mariana Gobbato Neuls, Maria Inês Mascarenhas Jobim, Rodrigo Costa Mattos,

Ricardo Macedo Gregory, Giovani Casanova, Gabriel Davolli, Amy Downing

Faculdade de Veterinária – REPROLAB – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Resumo

A inseminação artificial em caninos representa uma atividade importante no manejo reprodutivo desta espécie. O uso de sêmen resfriado, preservado por um determinado espaço de tempo, com a conservação da viabilidade espermática torna-se indispensável. Para a preservação a 4°C torna-se necessário o conhecimento de curvas de resfriamento mais adequadas para um determinado diluente a ser utilizado. No presente experimento foram utilizados 11 cães adultos, dos quais foram colhidos 5 ejaculados de cada e que após exame imediato avaliando aspecto, volume, motilidade, vigor, concentração, HOST (teste hiposmótico), IME (integridade de membrana) e formas patológicas, foram submetidos a diluição com tris-gema. Após a diluição os ejaculados foram novamente avaliados quanto à motilidade, vigor, HOST e IME. Foram iniciados dois procedimentos de refrigeração dos ejaculados fracionados, um a uma velocidade de $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ e outro a $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Vinte quatro e quarenta e oito horas após foram avaliados motilidade e vigor nas duas amostras. Os exames de HOST e IME foram realizados após quarenta e oito horas de resfriamento. Diferenças quanto à qualidade do sêmen dos diferentes cães foram encontradas. Quanto as diferentes velocidade de resfriamento não foram observadas diferenças. Foram constatadas diferenças na qualidade do sêmen recém diluído e após o resfriamento, porém a qualidade do sêmen se manteve inalterada entre vinte e quatro e quarenta e oito horas após o resfriamento.

Palavras Chave: Cães, inseminação artificial, sêmen resfriado, velocidade de refrigeração

Abstract

The artificial insemination in canines represents an important activity in reproductive management of this species. The use of chilled semen, preserved for a determined amount of time, with conserved spermatoc viability has become a necessity. For the preservation at 4° C it has become necessary to know the most adequate chilling curve for the chosen extender. In this experiment, 11 adult dogs were used, who each contributed 5 ejaculates which were immediately examined for volume, motility, vigor, concentration, HOST (hyposmotic test), IME (membrane integrity) and pathological forms, and then diluted with tris-egg yolk. The ejaculates were mixed with extender then evaluated for motility, vigor, HOST and IME. Two cooling procedures were started on the fractionate ejaculates, one at a velocity of -0.1°C per minute and the other at -0.3°C per minute. Twenty-four and forty-eight hours later the two samples were evaluated for motility and vigor. The HOST and IME exams were performed forty-eight hours after chilling. Differences in semen quality were found between the different dogs. There were no differences with the two cooling rates. Differences were found in semen quality right after dilution and after the colling process; however semen quality shows no difference between twenty-four and forty-eight hours after chilling.

Keywords: Dogs, artificial insemination, chilled semen and cooling rates.

Introduction

With the growth of dog breeding industry and the most frequent utilization of sires farthest away from the females, the use of chilled semen is becoming routine in the world of canine reproduction. The semen can be preserved around 4°C for a determined amount of time. (CHRISTIANSEN, 1988 ; LINDE-FORSBERG et al.,1995 e FELDMAN & NELSON, 1996). For the cooling process an extender is added to the semen which functions to protect the spermatozoa cellular membrane, to avoid lesions during the cooling process and potential physical damage during shipping of the semen. Another function of the extender is to provide nutrients and aid in the maintenance of the pH. (LINDE-FORSBERG, 1991). The most commonly used semen extenders are: Tris-yolk, Citrate-yolk, skim milk, citrate-bicarbonate-yolk, low fat milk. (CONCANNON E BATTISTA, 1989). The extender provides the sperm nutritive support and protection during the chilling process, thereby reducing the effects of thermal shock.(NELSON E COUTO, 1994) and prolonging its life (BRINSKO & VARNER, 1992).

The diminished temperature provokes many biological alterations which allow sperm to suffer thermal shock, thereby altering the motility, plasma membrane and acrosome (JASKO, 1994). The thermal shock is evidenced microscopically by the presence of sperm with circular movements and the premature loss of motility (AMANN & PICKETT, 1987). The damage caused to the sperm varies with the specie, dilution rate, cooling curve, temperature and storage period (PICKETT & KOMAREK, 1967). The dog sperm is more resistant to thermal shock than bovine, ovine and swine sperm (BOUCHARD ET AL., 1990). However, the thermal shock resistance can vary in the same specie (PURSEL ET AL., 1973), and can even vary between the ejaculates of the same animal. (MAGNAGO, 2000).

In comparison to other species, little research has been done in canines to evaluate the effects of different chilling rates. Olar et al (1989) froze canine semen with different extenders, evaluated the velocity of chilling the semen until 4 ° C prior to freezing (equilibrium period). They concluded that canine semen supports variation in chilling curve during the equilibrium period without effecting the fertility post thawing. With the objective to evaluate different chilling rates in equine diluted semen and the effects on final motility, Varner et al (1989) observed good results when the chilling rate was at -0,3 ° C

per minute Velocities between -0,9 ° C to -1,3 ° C, showed harmful effects, resulting in significant decrease in sperm motility. In equine specie, Sieme (2005) refers that a semen chilling curves between -0,05° C to -0,1° C per minute would be the ideal. However in practical conditions this rate would be to slow.

The objective of this study was to evaluate the performance of an extender (tris-yolk) submitted to two different cooling rates, comparing the morphophysiological characteristics of the chilled semen until 48 hours.

Material and Methods

Location

The semen collections were done in a private kennel and the analysis were done at the Animal Reproduction Laboratory (REPROLAB) at the University of Veterinary Medicine at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Animals

A total of eleven dogs were used (5 pointer, 3 veadeiro pampeano and 3 whippet), with ages ranging from one year to eight years. All of the dogs were in good health with correct nutrition and sanitary conditions.

Semen Collection

The technique used for semen collection was digital manipulation (MIES FILHO, 1987) in the presence of bitch in heat. Five ejaculations were collected from each animal, for a total of fifty-five ejaculates.

The collection was done using a plastic funnel attached to a plastic tube and the semen kept in a water bath at 37°C until the end of the evaluation and dilution. All

equipment was previously cleaned and sterilized. The first and second fractions were collected, wasting the third fraction.

Laboratory Analysis

The volume was measured through a graduated tube, previously sterilized and kept in the water bath awaiting semen collected. The color was analyzed and classified as cloudy or reddish. The sperm motility and vigor were evaluated at the following times, fresh, 0 hours, 24 hours and 48 hours. Before a sample was taken for evaluation, the semen was gently mixed to guarantee the homogeneity. A drop of semen was instilled on the microscope slide that was preheated to 37°C, covered with a cover slip, and evaluated at a magnitude of 200x. The obtained motility results were expressed in percentage between 0-100% and the vigor was classified from 1 to 5, according to the progressive motility observed. The concentration obtained was represented in millions of sperm cells per ml. The spermatic morphology was evaluated with fresh semen from each one of the collections. Semen smears were made and stained with eosine-nigrosine (stain STF, Lane Manufacturing, Denver, CO) or with modified Giemsa (Diff Quick). Two hundred cells were evaluated in each smear and the result expressed in percentage of normal cells. The morphological abnormalities were classified as primary defects and secondary defects (occurs during epididymal storage or preparation of the slide).

Hyposmotic Test

The hyposmotic test was used for evaluation of the membrane functionality at fresh, zero and 48 hours. The test consisted of mixing 100µl of semen in 200µl of hyposmotic solution (100mOsm/Kg), according to Lagares (1995). This dilution was made in a test tube that was taken to a water bath at 37°C for 8 minutes. Twenty micro liters of formaldehyde saline was then added. The analysis were made with a contrast microscope with a magnitude of 400x. A drop of each sample was observed and 100 sperm cells were

counted in each slide. The membranes were considered to be functional on those sperm cells showing a bent tail.

Fluorescence Test

The fluorescence test was used to evaluate the plasma membrane integrity at fresh, zero and 48 hours. For this analysis, added to a test tube rolled in aluminum foil, 475µl of semen, 10µl of 6- carboxy-fluorescein diacetate (C-FDA), 5µl of propidium iodide and 10µl of paraformaldehyde (HARRISON & VICKERS, 1990). The tube containing the mixture was taken to a water bath at 30°C for 8 minutes.

A drop was placed on a slide and taken for analysis to a epifluorescence microscope with the magnitude of 1000 x. In each sample 100 sperm cells were counted. The spermatic cells were classified as intact membranes (entire sperm cell stained green - carboxy-fluorescein) and damaged membranes (entire sperm cell stained red - propidium iodide). For comparison of the treatments, sperm with intact membranes were considered viable and with damaged membranes were considered nonviable.

Extender

The extender used in this experiment was TRIS-yolk. To produce the extender 3,025g tris- hydroxy-methyl-aminomethane, 1.7g monohydrated citric acid, 1.25g of D-fructose were diluted in 100ml of distilled water. From this mixture, 20ml were removed and substituted with the same volume of egg yolk from an egg laid that day. The extender was stored in 20ml amounts in a freezer for a maximum of 30 days.

Dilution of Semen

To make the dilution the ejaculate containing the first and second fraction were centrifuged at 800g for 10 minutes. The prostatic fluid was removed until the concentrations reached 70×10^6 sperm cells per vial. The dilution used was 1 ml of semen

for 3 ml of extender (1:3). The extenders were heated in a water bath at 37°C so that the semen and extenders would be at the same temperature at the time of dilution.

Chilling Curves

After the dilution the sample was divided in half and chilled using two different curves, one low and one fast. After four hours the tubes were placed in an incubator at 4°C, where they remained until final evaluation.

To establish the chilling curves a digital thermometer was used. The thermometer's sensor was introduced in the sample containing the semen and extender while the body, visualizing the temperature remained outside of the incubator. This allows for observation in the decrease of temperature, which was measured every 15 minutes for 4 hours. Three curves were used to find the average velocity for the chilling curve, which established the rapid curve at -0.3°C per minute and -0.1°C per minute for the slow curve.

Statistical Analysis

The statistical analyses were done by analysis of variance, having as principal variables: dogs, type of treatment, duration of storage; and dependent variables: motility, vigor, plasma membrane integrity, and membrane functionability.

The average of each treatment was compared to the Tukey test. The confidence interval was 0.05.

Results

The color and odor of the semen of the different dogs exhibited similarities between the ejaculates, this being cloudy referring to color and "sui generis" referring to odor.

Table 2 shows the average values of all the dogs in the five collections for each of the evaluated parameters.

Table 1: Average value (Average) and stander deviation (E.D.) found in 5 semen collections of the dogs for each of the evaluated parameters.

<u>Parameters</u>	<u>Average</u>	<u>E.D.</u>
VOLUME (mL)	4.98	1.80
<u>MOTILITY</u> (%)	83.90	17.30
VIGOR (1 – 5)	4.45	0.78
CONCENTRATION/mL	363.70	191.42
<u>TOTAL NUMBER SPERM CELLS</u> x 10 ⁶	1846.00	1151.70
<u>NORMAL MORFOLOGY</u> (%)	88.98	7.80
HYPOSMÓTIC TEST (%)	88.13	10.21
<u>INTACT PLASMA MEMEBRANE</u> (%)	66.00	13.44

The statistical analysis reveals the existence of a difference between the dogs in relation to volume, concentration per ml and total concentration.

Table 2: Percentage of motility and vigor of the chilled semen using slow chilling curve at different evaluated times.

HOUR	MOTILITY (%)	VIGOR (1-5)
0	78,53 ± 22,63 ^a	4,47 ± 1,08 ^a
24	72,09 ± 29,47 ^b	3,92 ± 1,46 ^b
48	68,09 ± 30,68 ^b	3,81 ± 1,53 ^b

Different characters (a,b) in columns indicate significant difference.

Table 3: Percentage of motility and vigor of the chilled semen using fast chilling curve at different evaluated times.

HOUR	MOTILITY (%)	VIGOR (1-5)
0	78,53 ± 22,63 ^a	4,47 ± 1,08 ^a
24	66,89 ± 31,53 ^b	3,75 ± 1,31 ^b
48	66,18 ± 31,03 ^b	3,74 ± 1,43 ^b

Different characters (a,b) in columns indicate significant difference.

The data in table 3 and 4 comparing chilled canine semen motility and vigor on a fast (-0.3° C/min) or slow (-0.1° C/min) curve did not demonstrate a difference. However,

the analysis revealed a difference in the parameters between the quality of fresh semen and the chilled semen by the two methods. This difference is not verified between 24 and 48 hours.

Table 5: Percentage of function membrane (HOST) and plasma membrane integrity (PIM) of the chilled semen in slow chilling rate at the different evaluated times.

HOUR	HOST (%)	PIM (%)
0	81.36 ± 12.12 ^a	70.04 ± 11.70 ^a
48	76.22 ± 12.21 ^b	62.96 ± 18.56 ^b

Different characters (a,b) in columns indicate significant difference.

Table 6: Percentage of function membrane (HOST) and plasma membrane integrity (PIM) of the chilled semen in fast chilling rate at the different evaluated times.

HOUR	HOST (%)	PIM (%)
0	81.36 ± 12.12 ^a	70.04 ± 11.70 ^a
48	79.24 ± 11.02 ^b	65.86 ± 13.34 ^b

Different characters (a,b) in columns indicate significant difference.

Relating to the hyposmotic test and plasma membrane integrity, the chilling rates did not interfere with the spermatic quality. On the other hand, the evaluations at 0, and 48 hours showed a difference.

Discussion

The canine sperm concentration can vary from 200 million to 10 billion total sperm cells per ejaculation, although the average concentration is 500 million sperm cells (JOHNSTON, 1991; FELDMAN & NELSON, 1996; SILVA ET AL., 2003; THEREFALL, 2003). In the canine species the normal sperm morphology is 70% normal

sperm cells, with the number of primary defects not surpassing 10% (CBRD, 1998; THEREFALL, 2003). The motility and sperm concentration in canine semen varies with the age, breed, reproductive management and collection technique, also animal size, testicular and prostatic volumes have an influence (JOHNSTON, 1991). Total sperm concentration and normal morphology in dog's semen in this experiment match the patterns described before. The differences found in volume, concentration per mL and total sperm count in the ejaculate between the dogs used in the experiment, show what has being described by Johnston (1991), whom attribute this differences to the testicular volume, which has correlation to the body size. In this experiment were used dogs from 3 different breed sizes, so those variations were expected.

The results founded confirm that dog semen can be chilled at 4° C for a determined period, as it has been described by Christiansen (1988); Linde-Forsberg et al.(1995) e Feldman & Nelson (1996). The semen were evaluated for 48 hours, as England and Ponzio (1996) had showed that to optimize the conception rate it is better to use the chilled canine semen within a period of 48 hours after collection. Considering that when using chilled semen the transportation time is hardly longer than 24 hours

The preservation of quality of the canine chilled semen using tris-yolk from the beginning until the end of the evaluation period accords with the described by Concannon and Battista (1989), who quote this extender as the chosen one for this biotechnology.

The motility and vigor evaluation on the two chilling rates (slow -0,1°C/minute or fast -0,3°C/minute) were similar in the analyzed ejaculates. Olar et al (1989) refers that canine semen supports variations in chilling curves. In the other hand, Varner et al (1989) have the opinion that the temperature dropping for diluted canine semen should be close to -0,3°C, faster rates as -0,9°C already have harmful effects in sperm motility. It is interesting to refer Sieme (2005) whom finds better results in equine semen using chilling rates between -0,05°C to -0,1°C per minute. They consider the appliance of this chilling rate difficult to use in the routine, as it requires more labor time. The evaluations done in this study did not evidence differences in the two chilling rates, showing the viability to use in the routine of artificial insemination with canine semen, faster chilling rates, as the -0,3° C.

As previously described by Jasko (1994) that the decrease of temperature alters the sperm quality, was confirmed by this study. Besides, no differences have been showed in the different curves, it was found that the quality in fresh semen and right after the dilution

are better than 24-48 hours after cooling at 4°C. The results from this experiment also shows that the more drastic changes in semen quality occurs in the first 24 hours, having no differences in the parameters evaluated from this moment until the 48 hours.

Relating to the hyposmotic test and plasma membrane integrity, the chilling rates did not interfere with the spermatic quality. On the other hand, the evaluations at 0 and 48 hours showed a difference. Theses finding accords with previous observations of Jasko (1994) that while time passes, associated to thermal chock, the sperm cells show alterations not only in motility, but also damages in plasma membrane and acrosome. In compensation Kumi-Diaka & Badtram (1994) didn't find harmful damage in sperm plasma membrane of canine semen after cooling.

Conclusion

The canine semen can be cooled at 4°C using tris-yolk extender without significant harmful effects in sperm quality.

The slow chilling rate did not showed advantages about the fast chilling rate. This fact permits its indication in the routine of canine artificial insemination with chilled semen.

There is a tendency to a more significant worsening in the quality of the ejaculation on the first 24 hours of chilling.

References

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **J. Androl.**, v.10, p. 89-98, 1989.

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

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 spermatozoal motility. **Theriogenology**, v.34, n.1, p.147-157, July 1990.

BRINSKO, S. P. VARNER, D. D. Artificial insemination and preservation of sêmen. In: Blanchard, t. l.; Varner, d. d. Stallion management. **Vet. Clin. North Am.: Equine Practice**, v.8, n.1, p.205-218, 1992.

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

CONCANNON. P.W; BATTISTA, M. Canine sêmen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. (Ed). **Current veterinary therapy X**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989. p. 1247-1258.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CUNHA, I. C. N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicina-gema**. Botucatu: UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária , Dissertação Mestrado, 1997.124p.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W. E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v.37, p. 373-381, 1992.

ENGLAND, G.C.W; PLUMER, J. M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa., **J. Reprod. Fertil.** Suppl. 47,p.261-270, 1993.

ENGLAND, G. C. W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v.46, p.165-171, 1996

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia, W. B. Saunders, p.487, 1996.

GILL, H. P.; KAUFMAN, C. F.; FOOTE, R. H.; KIRK, R. W. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid storage, and frozen stored semen. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, USA. v.31, n.10, p.1807-1813, 1970.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.88, n.1, p.343-352, 1990.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. **Anim. Reprod. Sci.**, v.51, p.321-332, 1998.

JOHNSTON, S. D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Vet. Clin. North Am. Small Animal Pract.**, v.21, n.3, p.545-551, 1991.

JONHSON, L.A.; MAXUEL, W.M.C.; BRISKY, J.R. Staining sperm or viability assessment. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 31, n.1, p. 37-45, 1996.

KOHNE, K.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; TOPFER-PETERSEN, E.; KLUG, E. Osmotic Resistenz von Hengstspermien und deren Beziehungen zur Flüssig- und Tiefgefrierkonservierungsfähigkeit. **Reprod. Dom. Anim. Suppl.**, v.3, p.128, abstr., 1995.

KUMI-DAKA, J.; BADTRAM, G. Effect of Storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. **Theriogenology**, v.41, p.1355-1366, 1994.

LAGARES, M. A.; **Bestimmung der osmotischen Resistenz von Hengstsamenzellen.** Tese Doutorado, Escola Superior de Vet. de Hannover, Alemanha, 1995.

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.21, p.467-485, 1991.

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

MAGNAGO, L. P. G. M. **Avaliação física e morfológica do sêmen de cães da raça Pastor Alemão resfriado a 5° C.** Dissertação Mestrado, UFMG, Belo Horizonte, 2000, 79p.

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 6ed. Sulina, 2v., 1987.

OLAR, T. T.; BOWEN, R. A.; PICKETT, B. W. Influence of extender, cryoprotective and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v. 31, p. 451-461, 1989

NELSON, R.W.; COUTO, C. G. **Fundamentos da medicina interna de pequenos animais.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.526-529 Inseminação artificial e sêmen congelado., 1994.

PICKETT, B.W.; KOMAREK,R.J. Effect of cold shock and freezing on loss of lipid from spermatozoa. **J. Dairy Sci.** v. 50, n. 5, p.753- 757, 1967

PROVINCE, C. A.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**, v.22, p.409-415, 1984

PURSEL,V.G.; JOHNSON,L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **J. Anim. Sci.** v. 37, n. 2, p.528 – 531, 1973.

QUINN, P. J.; WHITE, I. G. The effect of cold shok and deep-freezing on the concentration of major captions in spermatozoa. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v.12, n.2, p.263-270, 1966.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; Effets of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4o C. **Theriogenology**, v. 44, p.885-900, 1995.

SEAGER, S. W. J.; FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Lab. Anim. Sci.**, v.22, p.177-182, 1972.

SIEME, H. Instrumentelle Besamung in der Pferdezucht . In **Reproduktionsmedizin Beim Pferd**. Christine Aurich. Stuttgart: Paul Parey, 2005. Cap, 361. p. 297-327.

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

THERELFALL, W.R. Semen collection and evaluation. In: KUSTRITZ, M.V.R. **The practical veterinarian: Small Animal Theriogenoly**. Elsevier Science, USA, 2003. p.97-124.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; MEYERS, P. J. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. **Theriogenology**, v.32, n.4, p. 515-525, 1989.

VARNER,D.D., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.L. GARCIA M.C., KENNEY, R.M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, vol 29 p.1043-1054, 1988

ZUCCARI, C.E.S.N. **Efeito da cripreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. 1998. 121p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições de realização deste trabalho, com os cães utilizados, mostrou que sêmen canino pode ser resfriado até 4°C utilizando o diluidor tris-gema sem maiores prejuízos à qualidade espermática.

A velocidade de resfriamento denominada de lenta (-0,1°C por minuto) que é, de acordo com a literatura, mais adequada para preservação do ejaculado a 4°C, não apresentou vantagens sobre aquela mais rápida (-0,3°C por minuto), o que nas condições de trabalho rotineiro de processamento e transporte de doses inseminantes é interessante.

Apesar da tendência a uma piora mais significativa na qualidade do ejaculado após as primeiras 24 horas de resfriamento, na sua permanência resfriado até as 48 horas de observação pode-se perceber um grau de preservação do ejaculado ainda compatível com a sua utilização em programas de inseminação

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, P. H. P.; COSTA, M. E. L. T.; ABREU, J. J.; ABREU, C. P. Coleta e avaliação de sêmen canino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.46, n.5, p.537-544, 1994.

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **J. Androl.**, v.10, p. 89-98, 1989.

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

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 spermatozoal motility. **Theriogenology**, v.34, n.1, p.147-157, July 1990.

BRINSKO, S. P. VARNER, D. D. Artificial insemination and preservation of sêmen. In: Blanchard, t. l.; Varner, d. d. Stallion management. **Vet. Clin. North Am.: Equine Practice**, v.8, n.1, p.205-218, 1992.

BUSH, W. Kunstliche Besamung bei Hund. In: BUSH, W.; LOHLE, K.; PETER, W. **Künstliche Besamung bei Nutztieren**, 2ed. Stuttgart, Gustav Fisher, p.665, 1991.

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

CONCANNON, P.W. ; Reproduction in the dog and cat. In: **Reproduction in Domestic Animals** 4e, San Diego Academic Press , 1991.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine sêmen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. (Ed). **Current veterinary therapy X**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989. p. 1247-1258.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CUNHA, I. C. N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicina-gema**. Botucatu: UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária , Dissertação Mestrado, 1997.124p.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D.; ZUCCARI, C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. Proceedings... Mato Grosso: Brasil, 1996. p.411.

DOBRINSKI, I.; LULAI, C.; BARTH, A. D.; POST, K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post thaw viability of dog semen. **J. Reprod. Fert**, Suppl. 47, p.291-296, 1993.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W. E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v.37, p. 373-381, 1992.

ENGLAND, G.C.W; PLUMER, J. M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa., **J. Reprod. Fertil**. Suppl. 47,p.261-270, 1993.

ENGLAND, G. C. W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v.46, p.165-171, 1996

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. In: International Congress On Animal Reproduction, 13, 1996 Sidney. **Proceedings**, Dep. of Anim. Sci., v.42, p.251-260, 1996.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia, W. B. Saunders, p.487, 1996.

FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog sêmen. **Am. J. Vet. Res.**, v.25, p.32-36, 1964.

FOOTE, R. H.; LEONARD, E. P. The influence of ph and osmotic pressure, glycine and glycerol on survival of dog sperm buffered – yolk extenders. **Cornell Vet.**, v.54, n.1, p.78-89, 1964.

FRASER, L.R. Mouse sperm capacitation "in vitro" involves loss of surface associated inhibitory component. **J. Reprod. Fertil.**, v.72, p.373-384, 1984.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol. Reprod.**, v.34, p.127-138, 1986.

GILL, H. P.; KAUFMAN, C. F.; FOOTE, R. H.; KIRK, R. W. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid storage, and frozen stored semen. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, USA. v.31, n.10, p.1807-1813, 1970.

GUNZEL-APEL, A.R. ; HILLE, P. ; Spontaneous and GnRH Induced pulsatile LH and testosterone release in pubertal , adult and male beagles. **Theriogenology**, v.41, p.737-745, 1994.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.88,n.1, p.343-352, 1990.

HARROP, A. E. Artificial insemination in dogs: the first transatlantic conception. **Brit. Vet. J.**, v.112, n.8, p.338-340, 1956.

HELD, J.P. ; Critical evaluation of the success and failure of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. **Canine male reproduction symposium**, p. 49-60, September, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. **Anim. Reprod. Sci.**, v.51, p.321-332, 1998.

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

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars. Vet.**, v.10, p. 156-165, 1994.

JOHNSTON, S. D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Vet. Clin. North Am. Small Animal Pract.** v.21, n.3, p.545-551, 1991.

JONHSON, L.A.; MAXUEL, W.M.C.; BRISKY, J.R. Staining sperm or viability assessment. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 31, n.1, p. 37-45, 1996.

KENNEY, R.M.; HURTGEM, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion.** Hastings- E.U.A., Society for Theriogenology , 1983.

KOHNE, K.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; TOPFER-PETERSEN, E.; KLUG, E. Osmotic Resistenz von Hengstspermien und deren Beziehungen zur Flüssig- und Tiefgefrierkonservierungsfähigkeit. **Reprod. Dom. Anim. Suppl.**, v.3, p.128, abstr., 1995.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, n.6, p.1279-1289, 1993.

KUMI-DAKA, J.; BADTRAM, G. Effect of Storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. **Theriogenology**, v.41, p1355-1366, 1994.

LAGARES, M. A.; **Bestimmung der osmotischen Resistenz von Hengstsamenzellen.** Tese Doutorado, Escola Superior de Vet. de Hannover, Alemanha, 1995.

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.21, p.467-485, 1991.

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

LINDE - FORSBERG, C. ; STRÖM, B. ; ROTA, A. ; Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen thawed dog semen. **Theriogenology**, v. 52, p. 11-23, 1999.

MAGNAGO, L. P. G. M. **Avaliação física e morfológica do sêmen de cães da raça Pastor Alemão resfriado a 5° C.**Dissertação Mestrado, UFMG, Belo Horizonte, 2000, 79p.

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 6ed. Sulina, 2v.,1987.

OETTLE, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.257-260, 1993.

OETTLÉ, E. E.; SOLEY, T. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. **Vet. Med. Review**, v.59, p. 28-70, 1988.

[OLAR, T. T.; BOWEN, R. A.; PICKETT, B. W. Influence of extender, cryoprotective and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v. 31, p. 451-461, 1989](#)

NELSON, R.W.; COUTO, C. G. **Fundamentos da medicina interna de pequenos animais.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.526-529 Inseminação artificial e sêmen congelado., 1994.

PEÑA, A. **Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación.** Santiago de Compostela: Espana, 1997. 329p Tesis Doctoral-Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela.

PEÑA, A.I. ; et al ; Effect glycerol treatments on frozen thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-174, 1998.

PICKETT, B. W. Seminal extenders and cooled semen. In: Mc KINNON, A. O., **Equine Reproduction**, Malvern: Lea e Fabiger, p.746-754, 1993.

PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SEIDEL, G.E.; BERNDTSON, W.E; VOSS, J.L. Reproductive physiology of stallion. VI - Seminal and behavioral characteristics. **J. Anim. Sci.**, 43,p. 617-625, 1976.

PICKETT, B.W.; KOMAREK,R.J. Effect of cold shock and freezing on loss of lipid from spermatozoa. **J. Dairy Sci.** v. 50, n. 5, p.753- 757, 1967

PICKETT, B.W.; VOOS, J.L. Reproductive management of the stallion. IN: 18th Annual Convention A.A.E.P, **Proceedings.**, P.501-531, 1972.

PROVINCE, C. A.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**, v.22, p.409-415, 1984

PURSEL,V.G.; JOHNSON,L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **J. Anim. Sci.** v. 37, n. 2, p.528 – 531, 1973.

QUINN, P. J.; WHITE, I. G. The effect of cold shok and deep-freezing on the concentration of major captions in spermatozoa. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v.12, n.2, p.263-270, 1966.

RENTON, J.P.; HARVEY, M.J.A.; HARKER, S. A spermatozoal abnormality in dogs related to infertility. **Vet. Rec.**, v.118, p. 429-430, 1986.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; Effets of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4o C. **Theriogenology**, v. 44, p.885-900, 1995.

SEAGER, S. W. J.; FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Lab. Anim. Sci.**, v.22, p.177-182, 1972.

[SIEME, H. Instrumentelle Besamung in der Pferdezucht . In **Reproduktionsmedizin Beim Pferd**. Christine Aurich. Stuttgart: Paul Parey, 2005. Cap. 361. p. 297-327.](#)

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação Artificial em cães. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIQUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Varela, 2002. p. 70-73.

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

SOUZA, F.F. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. 2003. 98p. tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

THERELFALL, W.R. Semen collection and evaluation. In: KUSTRITZ, M.V.R. **The practical veterinarian: Small Animal Theriogenoly**. Elsevier Science, USA, 2003. p.97-124.

VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães. **Clínica Veterinária**, v. 3, n. 15, p. 22-26, 1998.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; MEYERS, P. J. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. **Theriogenology**, v.32, n.4, p. 515-525, 1989.

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

WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reprod. Dom. Anim.**, v.31, n.1, p.135-140. 1996.

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. **Rev. Reprod. Biol.**, v.1, p.283-350, 1979.

WATSON, P.F. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing. **J. Therm. Biol.**, v.1, p.137-141, 1976.

WATSON, P. F.; PLUMMER, J. M.; ALLEN, W. E.; Quantitative assessment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**v.35, p. 651-653, 1987.

ZUCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. 1998. 121p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu).