

Métodos de avaliação do sêmen canino congelado

Methods to evaluate frozen canine semen

Rita de Cássia Soares *Cardoso*¹; Alexandre Rodrigues *Silva*²; Lúcia Daniel Machado da *Silva*³

¹Universidade Federal do Piauí-Campus Profa. Cinobelina Elvas

²Universidade Federal Rural do Semiárido

³Universidade Estadual do Ceará-Laboratório de Reprodução de Carnívoros

¹Correspondência: cardosorcsc@yahoo.com.br.

Resumo

A criopreservação é uma biotécnica que permite o armazenamento de material genético por um tempo indefinido, mas que causa uma diminuição na qualidade espermática após a descongelação. Para conhecer a extensão dos danos causados à célula espermática e poder aperfeiçoar os métodos de criopreservação, é de grande importância a análise de parâmetros que não são rotineiramente empregados na avaliação padrão. O objetivo desta revisão é descrever métodos *in vitro* e *in vivo* para avaliar a qualidade do sêmen canino após a congelação. Dentre os diversos testes *in vitro*, a análise da motilidade, vigor e morfologia espermática, teste hipoosmótico, teste de termorresistência, avaliações por citometria de fluxo e análise computadorizada são os mais utilizados. Embora os testes *in vitro* sejam capazes de prever a fertilidade de um macho, somente a taxa de fertilidade *in vivo* demonstra um resultado mais confiável acerca do sucesso da criopreservação de sêmen.

Palavras-chave: sêmen, cão, congelação, avaliação.

Abstract

The standard semen analysis is routinely used to evaluate sperm quality such as motility, vigor and sperm morphology. However, these characteristics are not sufficiently accurate to predict the fertility of an ejaculate. The cryopreservation is a biotechnical that allows to storage genetic material for a long time but causes a decrease in sperm quality after thawing. The analysis of other parameters not used in standard analysis is important to know the type and extent of damage caused to the spermatozoa and to improve the methods of cryopreservation. The aim of this review was to show some in vitro and in vivo assays to evaluate canine semen cryopreservation. It can be reported some assays such as analysis of sperm motility, vigor and morphology, hypoosmotic test, thermoresistance, flow cytometry, computerized systems and others. Although in vitro assays can predict the fertility of a male, in vivo assays are more reliable regarding semen cryopreservation.

Keywords: semen, dog, freezing, evaluation

Introdução

O aumento no interesse por parte dos criadores em incrementar a eficiência reprodutiva dos seus animais tem levado a um maior desenvolvimento da criação de cães. Neste sentido, a preservação de gametas masculinos é uma valiosa ferramenta, uma vez que a congelação possibilita o transporte do sêmen, bem como o seu armazenamento por um tempo prolongado (Ström, 1999).

O conceito de preservação da célula espermática, inequivocadamente, implica a preservação de sua capacidade funcional, isto é, a habilidade para produzir descendentes, o que, necessariamente, envolve a manutenção da integridade celular espermática, a habilidade em penetrar o ovócito e a competência para suportar o desenvolvimento embrionário (Harrison *et al.*, 1996). Infelizmente, não há um único teste *in vitro* que seja capaz de mensurar todas essas funções em uma amostra. Contudo, uma quantificação fidedigna do percentual de espermatozoides que possuem essas características, separadamente, pode ser um importante indicador da capacidade funcional espermática (Amann e Hammerstedt, 1993).

A avaliação padrão do sêmen é, primariamente, baseada em parâmetros físicos. Contudo, há evidências de que tais parâmetros, isoladamente, não são suficientes para determinar um padrão de fertilidade de um ejaculado. Além disso, os indicadores de integridade física, rotineiramente utilizados na avaliação do sêmen, não são capazes de mensurar os complexos eventos físicos e bioquímicos que envolvem o processo de fertilização (Jeyendran *et al.*, 1984). Neste sentido, a união de testes *in vitro* e *in vivo* é de grande importância para se avaliar os efeitos da criopreservação sobre a qualidade espermática.

Esta revisão tem como objetivo ressaltar os diferentes testes que podem ser utilizados na avaliação dos métodos de criopreservação do sêmen canino.

Métodos de avaliação *in vitro*

A alta taxa de fertilidade é o objetivo principal quando se trabalha com criopreservação do sêmen. Contudo, testes de fertilidade, além de apresentarem um alto custo, têm a desvantagem de apresentar baixa confiabilidade se poucos animais são usados (Rota *et al.*, 1999a; Tardif *et al.*, 1999). As análises *in vitro* têm a vantagem de mostrar quais aspectos da função espermática foram prejudicados ou mantidos, sendo isso de especial interesse ao se trabalhar com o aprimoramento de técnicas de preservação de sêmen, bem como para a pesquisa fundamental. Várias técnicas *in vitro* têm sido descritas para a avaliação do sêmen, porém a combinação de diferentes métodos de avaliação fornece um resultado mais confiável do que um único teste quando se deseja prever a fertilidade *in vivo* (Ström, 1999). A seguir, serão descritos alguns métodos que podem ser usados para se avaliar o sucesso da criopreservação de sêmen canino.

Motilidade e vigor espermático

A avaliação da motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para a avaliação do sêmen, definida como a porcentagem de espermatozóides móveis da amostra avaliada imediatamente após a colheita ou após a criopreservação do sêmen (Seager e Fletcher, 1972). A avaliação da motilidade após a criopreservação tem como objetivo verificar a proporção de espermatozóides que mantiveram a motilidade após as injúrias causadas por esse processo de conservação (Peña, 2000). A proporção de espermatozóides exibindo motilidade progressiva é, geralmente, estimada, subjetivamente, no microscópio óptico de contraste de fase ou, de forma objetiva, utilizando-se a análise computadorizada (Peña Martinez, 2004).

O vigor espermático é um parâmetro, normalmente, avaliado em conjunto com a motilidade e é definido como a qualidade do movimento exibido pelos espermatozóides móveis. Para tanto, faz-se uso de uma escala compreendida numa faixa de 0 a 5 (Tab. 1), cujas classificações variam segundo os autores Platz e Seager (1977); Christiansen (1988) e Johnston *et al.* (2001).

Estudos têm demonstrado que tanto nos ejaculados frescos (Casey *et al.*, 1993) como nos congelados (Januskauskas *et al.*, 1996), há uma proporção de espermatozóides que são viáveis mesmo estando imóveis, podendo adquirir motilidade após estimulação com cafeína (Larsson *et al.*, 1976). Portanto, a avaliação da motilidade não pode ser usada como uma mensuração dos espermatozóides vivos e mortos, mas fornece a informação de um fator que é necessário para a capacidade fertilizante da célula espermática, pois ela é a manifestação da sua competência estrutural e funcional (Peña Martinez, 2004). Embora a motilidade esteja, geralmente, correlacionada à integridade da membrana plasmática (Kumi-Diaka, 1993), relatos de correlações entre a motilidade e a fertilidade ainda são conflitantes (Kjaestad *et al.*, 1993; Sanchez-Partida *et al.*, 1999; Tardif *et al.*, 1999).

Tabela 1. Escala utilizada para a classificação do vigor do sêmen canino.

Escala (0-5)	Classificação correspondente
0	Todos os espermatozóides sem movimento.
1	Movimentos lentos látero-laterais, sem progressão.
2	Rápidos movimentos látero-laterais, sem progressão.
3	Rápidos movimentos látero-laterais, com ocasional progressão.
4	Lenta e contínua progressão.
5	Rápida e contínua progressão.

Fonte: Christiansen (1988).

Morfologia espermática

A morfologia espermática é um parâmetro indispensável na avaliação seminal, pois é intrinsecamente implicada a problemas de fertilidade tanto na espécie canina como em outras espécies animais (Oetlé, 1993). Oetlé (1993) relatou que à medida que se aumenta o percentual de espermatozóides anormais, a fertilidade é reduzida, sendo observado que, quando a proporção de espermatozóides morfológicamente normais estava abaixo de 60%, a fertilidade foi adversamente afetada.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a morfologia da célula espermática. Esfregaços úmidos de sêmen podem ser examinados por microscopia de contraste de fase após a fixação com glutaraldeído ou tampão salina formolizada para manter as características celulares e permitir uma observação futura (Manual, 1998). A morfologia também pode ser avaliada microscopicamente, após o uso de corantes Wright, Rosa de Bengala, Diff-Quik, Spermac® (Purswell *et al.*, 1992; Oetlé e Soley, 1985; Ström *et al.*, 1997), Giemsa (Cardoso *et al.*, 2003), Hematoxilina-eosina (Silva *et al.*, 2003) e eosina-nigrosina (Peña, 2000).

O acrossoma do espermatozóide canino pode ser avaliado pela microscopia óptica em esfregaços

corados com eosina-nigrosina (Oettlé, 1986; Peña *et al.*, 1998a; b), giemsa (Dahlbom *et al.*, 1997) coloração tripla composta por rosa de bengala/azul de tripan/marrom de Bismarck (Talbot e Chacon, 1981), rosa bengala (Rodrigues, 1997) e Spermac[®] (Oéttle, 1993; Ström *et al.*, 1997).

Existem dois principais métodos de classificação das alterações morfológicas. Um deles é dividido em alterações primárias e secundárias (Johnston *et al.*, 2001), e o segundo em defeitos maiores e menores (Oettlé, 1993). Uma outra classificação pode dividir os defeitos maiores e menores quanto à região do espermatozóide em que está situada a alteração, ou seja, cabeça, peça intermediária e cauda (Cardoso *et al.*, 2003). Os defeitos maiores são aqueles que podem ter um efeito negativo maior na fertilidade, diferentemente dos menores (Oettlé e Soley, 1988). Oettlé (1993) descreve a união dessas duas últimas categorias, na qual, em cada região da célula espermática, os defeitos são agrupados em maiores e menores, como descrito na Tab. 2.

Tabela 2. Classificação morfológica do espermatozóide canino.

	Cabeça	Peça intermediária	Cauda	Acrossoma
Maiores	Macrocefalia	Gota citoplasmática	Cauda dupla	Vacúolos
	Microcefalia	proximal		Distribuição anormal
	Piriforme	Quebrada		
	Cabeça dupla			
Menores	Cabeça destacada	Gota citoplasmática	Enrolada	Reação do acrossoma
	Descondensação nuclear	distal	Quebrada	Edema

Fonte Adaptado de Oettlé (1993).

Capacitação

Para ser capaz de fertilizar o oócito, o espermatozóide necessita sofrer uma série de reações na membrana, durante sua permanência no trato genital feminino. Esse processo é conhecido como capacitação (Petrunikina *et al.*, 2003).

A capacitação, em cães, pode ser avaliada por diversos métodos, tais como a clortetraciclina (CTC), as lectinas e ainda, pela mensuração das características de motilidade, obtidas na análise computadorizada, as quais são indicativas de capacitação ou hiperativação (Rota *et al.*, 1999b). A CTC diferencia os espermatozoides nas seguintes categorias: não capacitado e com acrossoma íntegro, capacitado e com acrossoma íntegro e capacitado e com acrossoma reagido (Rota *et al.*, 1999b).

Recentemente, o termo criocapacitação tem sido introduzido para explicar o fato de que os procedimentos de criopreservação induzem alterações no espermatozóide, similares à da capacitação (Cormier e Bailey, 2003).

Reação do acrossoma

O acrossoma é uma vesícula contendo várias enzimas hidrolíticas, incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas, envolvidas no processo de fecundação (Garner e Hafez, 1995), desempenhando um papel crucial na função espermática. Eilts (2005) relatou que as mudanças físicas da RA após criopreservação são indicativas de que o espermatozóide não pode mais fertilizar, embora ainda possa estar móvel. Há indícios de que, na espécie canina, os espermatozoides com acrossoma íntegro e reagido são capazes de se ligar à zona pelúcida (Kawakami *et al.*, 1993). No entanto, pode ser que o espermatozóide com acrossoma reagido possa ser capaz de se ligar à zona pelúcida, mas não capaz de penetrar o oócito, visto que o acrossoma contém enzimas que são necessárias nesse processo (Kaji e Kudo, 2004).

Dois métodos foram desenvolvidos para avaliação acrossomal utilizando-se microscopia de fluorescência (Peña, 1997; Hewitt e England, 1998; Rota *et al.*, 1999b). Na primeira categoria, utilizaram-se lectinas marcadoras, anticorpos intracelulares, antígenos intracelulares e antígenos acrossomais, e, na segunda, utilizou-se a clortetraciclina (CTC) e anticorpos externos (Peña, 1997; Peña Martínez, 2004). As lectinas mais utilizadas são: "Pisum Sativum Agglutinin" (PSA-aglutinina da ervilha) e "Peanut Agglutinin" (PNA-aglutinina do amendoim), as quais se ligam ao conteúdo acrossomal (Rijsselaere *et al.*, 2005). Essas aglutininas podem ser usadas em associação com corantes fluorescentes, como Hoechst 33258 e 6-diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), associada ao iodeto de propídio (PI) (Rijsselaere *et al.*, 2005). A vantagem dos corantes fluorescentes consiste no fato de não ser necessária a remoção do meio de criopreservação, uma vez que não há a interferência de glóbulos de gordura ou de outro material não corado (Peña *et al.*, 1998b).

Outro método para avaliação da reação do acrossoma é a quantificação da liberação de enzimas acrossomais, como, por exemplo, a acrosina, que avalia, indiretamente, a integridade acrossomal do espermatozóide canino (Froman *et al.*, 1984). A imunofluorescência indireta, usando anticorpos monoclonais e

policlonais e CTC também pode ser utilizada para a avaliação da integridade acrossomal (Brewis *et al.*, 2001).

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método objetivo e acurado para a análise de células espermáticas, utilizando corantes fluorescentes sem adição de fixadores. A citometria de fluxo é utilizada para a avaliação da integridade de membrana plasmática (Peña *et al.*, 1998b). A avaliação desse parâmetro também pode ser realizada por meio da utilização de corantes fluorescentes em microscopia de fluorescência. No entanto, a citometria apresenta a vantagem de avaliar um maior número de células (10000) bem como a avaliação de outros parâmetros (morfologia geral do espermatozóide canino, integridade de organelas específicas) (Peña *et al.*, 1998b).

Teste de termorresistência (TTR)

A avaliação da longevidade dos espermatozóides *in vitro* pode ser realizada pelo teste de termorresistência (TTR). Ström *et al.* (1997) acreditaram que a termorresistência pós-descongelamento pode ser mais baixa para o espermatozóide canino, do que para outras espécies. Além disso, observaram que o espermatozóide canino mesmo com uma baixa termorresistência não tem, necessariamente, um baixo potencial fertilizante, visto que o sêmen congelado, com o método CLONE, apresentou uma baixa termorresistência e mostrou índices de fertilidade de 59,3% e 86,4%, após inseminação vaginal e intra-uterina, respectivamente (Govette *et al.*, 1996). Portanto, devido aos resultados divergentes a respeito de uma possível correlação entre o TTR e a fertilidade na espécie canina, ainda não é possível sugerir a aplicação desse teste como um parâmetro confiável na avaliação do sêmen canino.

Teste hipoosmótico

O teste hipoosmótico (HOST) avalia a integridade funcional da membrana espermática (Spittaler e Tyler, 1985), sendo essa importante para o metabolismo espermático. Esse teste consiste em submeter o espermatozóide canino a uma solução hiposmótica, verificando o percentual de células que sofreram o processo de edemaciação manifestado pelo percentual de caudas enroladas. Os espermatozóides com caudas enroladas são aqueles que apresentam a membrana funcional (Jeyendran *et al.*, 1984; Keel e Webster, 1990).

England e Plummer (1993) verificaram uma correlação negativa entre a osmolaridade e a porcentagem de espermatozóides caninos edemaciados em soluções aquosas hipoosmóticas à base de sacarose, frutose e citrato de sódio. Além disso, esses pesquisadores demonstraram não existir correlação entre a porcentagem de espermatozóides edemaciados e outros parâmetros seminais, tais como motilidade espermática, morfologia e porcentagem de vivos e mortos. Contrariamente, a edemaciação em resposta ao HOST já foi, positivamente, correlacionada com a motilidade espermática (Kumi-Diaka, 1993; Silva *et al.*, 2006), e com a motilidade e a viabilidade (Rodriguez-Gil *et al.*, 1994). Uma relação entre o HOST e a capacidade fertilizante do espermatozóide canino ainda não foi observada, porém tem sido demonstrada em outras espécies, como bovinos e humanos (Revell e Mrode, 1994; Jeyedran *et al.*, 1992).

Avaliação ultra-estrutural por microscopia eletrônica

É muito difícil detectar os danos celulares associados à criopreservação (Hammerstedt *et al.*, 1990). Microanálises por raio-X permitem a localização quantitativa dos elementos celulares na microscopia eletrônica (Rodriguez-Martinez e Ekwall, 1989). A integridade da membrana plasmática e do acrossoma do espermatozóide humano congelado, avaliado pela microscopia eletrônica, tem mostrado ser, positivamente, correlacionada com a fertilidade (Mahadevan e Trounson, 1984).

Utilizando a microscopia eletrônica, Rodrigues-Martinez *et al.* (1993) observaram que o espermatozóide canino descongelado apresenta um alto grau de danos no acrossoma, incluindo perda do conteúdo, rarefação e edemaciação, perda de material eletrodense e vesiculação da membrana acrossomal. Porém, o plasmalema, aparentemente, permaneceu íntegro, na maioria dos casos. Esses autores sugeriram que tal fato poderia ser a razão para a baixa porcentagem de anormalidades no acrossoma, normalmente notificadas quando se utiliza a microscopia de contraste de fase.

Análise computadorizada (CASA)

A análise computadorizada (CASA) permite uma avaliação objetiva e precisa, não somente sobre a proporção de células móveis em uma amostra de sêmen, mas também sobre a qualidade do movimento das mesmas. As trajetórias do espermatozóide, individualmente, são determinadas pela função flagelar e,

características como velocidade, frequência de batimento flagelar e amplitude irão, corretamente, refletir a condição fisiológica de cada célula (Peña, 2000). Os dados obtidos por esse método correspondem a centenas de mensurações espermáticas individuais, fornecendo informações sobre a qualidade média da motilidade em uma amostra de sêmen (Günzel-apel *et al.*, 1993) e sobre diferentes subpopulações espermáticas coexistindo na amostra (Holt, 1996; Peña Martínez, 2004). Além disso, algumas características do movimento espermático avaliadas pela CASA podem estimar a fertilidade *in vivo* e *in vitro* no homem e em touros (Tardif *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2000). Contudo, estudos similares objetivando estimar a fertilidade em cães não foram realizados.

O “Hamilton Thorne computer-aided semen analyzer” (HTR), versão IVOS10 (Hamilton Thorne Research, Beverly, USA), é um sistema de análise computadorizada proposto para avaliação do sêmen humano (Douglas-Hamilton, 1995). O HTR, que já foi validado para a espécie canina, representa uma importante ferramenta para futuros estudos andrológicos. Embora todos esses equipamentos para análise computadorizada também já tenham sido validados para a espécie canina, ainda estão muito longe de se tornarem comuns na prática veterinária devido ao seu alto custo, bem como à necessidade de padronização das técnicas (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001). No entanto, há disponível um equipamento com um preço mais acessível, o analisador de qualidade espermática (Sperm Quality Analyzer-SQA, United Medical Systems Inc., Santa Ana, CA, USA), que já foi validado para a avaliação do sêmen canino criopreservado (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001). Esse equipamento registra variações na densidade óptica, convertendo essa informação, por cálculos matemáticos, em um índice de motilidade espermática (SMI). Tal procedimento mostrou uma boa repetibilidade de resultados em amostras seminais de boa e ótima qualidade, observando altas correlações entre vários parâmetros seminais (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001). No entanto, ainda não foi determinada uma correlação entre o SMI e a fertilidade *in vivo* (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001).

É possível, também, que o “Hamilton-Thorne computer-aided semen analyser”, versão CEROS 12.1 (Hamilton Thorne Research, Beverly, USA), possa avaliar morfologia e morfometria espermática canina (Rijsselaere *et al.*, 2004). A análise de morfometria espermática automatizada (ASMA) tem o potencial de avaliar características espermáticas não observadas pela análise visual (Rijsselaere *et al.*, 2004). Por meio da ASMA, é possível avaliar as alterações das dimensões morfométricas dos espermatozoides que podem ser causadas pelo processo de criopreservação (Rijsselaere *et al.*, 2004).

Testes de interação oócito-espermatozoide

A ligação do espermatozoide à zona pelúcida (ZP) é um evento crítico na interação gametogênica que culmina com a fertilização do oócito (Mayenco-Aguirre e Pérez-Cortes, 1998). A habilidade de um espermatozoide de interagir, corretamente, com o oócito é crucial e dependente de vários fatores, incluindo a motilidade espermática e a fluidez de membrana.

A habilidade do espermatozoide em se ligar à ZP é um teste potencialmente valioso ao se avaliar técnicas de criopreservação do sêmen. Testes avaliando essa habilidade têm sido desenvolvidos para equinos (Fazelli *et al.*, 1993a), bovinos (Fazelli *et al.*, 1993b), suínos (Fazelli *et al.*, 1995) e caninos (Mayenco-Aguirre e Perez-Cortez, 1998; Ström Holst *et al.*, 2001).

Os testes de ligação do espermatozoide canino à ZP podem ser realizados utilizando-se oócitos homólogos íntegros (Ström Holst *et al.*, 2001) ou bisseccionados (hemizona) (Mayenco-Aguirre e Perez-Cortez, 1998). Segundo Olar (1984), a avaliação da capacidade fecundante do espermatozoide canino, imediatamente após o descongelamento, seria um parâmetro mais importante do que a simples observação da manutenção da motilidade após um período de incubação.

A interação oócito-espermatozoide pode ser avaliada pela fluorescência (Hoechst 33258) ou pela microscopia óptica (aceto-orceína), na qual se observa a presença de cabeças espermáticas ligadas à ZP ou no espaço perivitelínico e ooplasma do oócito (Hewitt e England, 1997).

O teste de penetração oocitária consome menos tempo do que fertilização *in vitro*, visto que não há a necessidade de maturar o oócito, e somente a ligação/penetração é avaliada e não o desenvolvimento embrionário (Hewitt e England, 1997). Além disso, as taxas de maturação de oócitos caninos ainda permanecem baixas. Isto pode ser devido a uma inadequada maturação nuclear e citoplasmática ocasionada pelos meios inapropriados de cultivo (Rodrigues e Rodrigues, 2003).

A ligação do espermatozoide na zona pelúcida e a penetração no ooplasma mostraram-se, intimamente, associada à motilidade espermática (Hay *et al.*, 1997), mas não se correlacionaram com a morfologia acrossomal (Rodrigues *et al.*, 2004).

Outros métodos de avaliação *in vitro*

A avaliação da motilidade espermática é, essencialmente, subjetiva, podendo causar uma alta variabilidade entre laboratórios ou observadores. Para controlar essa variabilidade, e padronizar a análise da

motilidade espermática várias tentativas têm sido realizadas (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001).

Várias técnicas têm sido propostas para superar essa subjetividade e fazer com que a análise da motilidade seja mais confiável. A turbidimetria é uma técnica baseada na avaliação espermática pelo “swim-up”, no qual a turbidez é registrada pela espectroscopia (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001). A espectroscopia a laser consiste na análise do movimento espermático induzido por variações no comprimento da onda. Contudo, se esses métodos físicos são interessantes, eles somente dão a informação sobre as características dos espermatozoides como um todo, sem descrever os parâmetros individuais. Além disso, esses testes são de difícil realização na prática clínica, bem como necessitam de um equipamento de alto custo (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001).

Para a avaliação espermática individual bem como para a avaliação da velocidade, técnicas envolvendo o filtro de acetato/nitrato (England e Allen, 1990) e progressão no muco cervical (Mole e Fitzgerald, 1990) têm sido propostas. No entanto, tais técnicas consomem muito tempo e os resultados são pouco confiáveis.

Vários estudos *in vivo* relataram que as principais reservas espermáticas no trato reprodutor da cadela são as criptas uterinas e a junção útero-tubárica (Rijsselaere *et al.*, 2004). Testes *in vitro* que investiguem a interação do espermatozóide com “explants” da tuba uterina podem fornecer informações sobre a fisiologia e os mecanismos dessa ligação, além de comparar a capacidade de ligação dos espermatozoides de diferentes ejaculados (Petrunkina *et al.*, 2004). No entanto, a capacidade de ligação do espermatozóide com “explants” de tuba ainda não foi correlacionada à fertilidade (Kawakami *et al.*, 2001; Petrunkina *et al.*, 2003; 2004) nesta espécie.

Avaliação da função espermática *in vivo*

Apesar de inúmeros testes *in vitro*, a forma mais segura de avaliar o sucesso do congelamento do sêmen é pelos resultados obtidos após inseminação artificial (IA) com o sêmen descongelado. Porém, é importante ressaltar que a fertilidade de um ejaculado é dependente da fertilidade da fêmea (Eilts, 2005). Amann (2005) relatou que a fertilidade de um garanhão pode ser tão alta quanto 95%, se a fertilidade da fêmea é de 90% e tão baixa quanto 24%, se a fertilidade da fêmea é de 25%. Para o cão, mesmo que a fertilidade de um macho já houvesse sido testada em um grande grupo de fêmeas férteis, a sua fertilidade não poderia ser prevista ao se utilizar um outro grupo de cadelas que tivessem fertilidade diferente (Eilts, 2005).

Há outros fatores que podem influenciar o resultado das IAs com sêmen congelado, tais como diferenças na qualidade e congelabilidade dos ejaculados de diferentes cães, número de espermatozoides inseminados, momento da inseminação e sítio de deposição do sêmen (Eilts, 2005).

Uma vez que muitos dos parâmetros avaliados *in vitro* não são correlacionados à fertilidade, a IA, de um grande número de fêmeas, é ainda o teste mais confiável para a comparação dos métodos de preservação do sêmen (Amann e Hammerstedt, 1993). Em cães, testes de fertilidade são difíceis de serem realizados devido ao número limitado de cadelas disponíveis e à longa duração do seu ciclo estral (Eilts, 2005). Eilts (2005) relatou que, para se ter um resultado estatisticamente significativo, no qual a diferença da taxa de fertilidade entre dois grupos seja de 30%, são necessárias 37 cadelas por grupo.

Considerações finais

Embora, sabendo que a análise espermática nunca terá o potencial de determinar a real fertilidade, amostras de sêmen com baixa fertilidade podem ser identificadas pela análise de múltiplas características (Graham, 1996). Um protocolo ideal de análise seminal deve ser objetivo, de fácil execução e acurado. Um sistema de análise deve mensurar várias características de centenas a milhares de células espermáticas, de maneira rápida e econômica (Graham, 1996).

Atualmente, diversos testes estão sendo utilizados para a avaliação do sêmen canino fresco e criopreservado. Alguns têm se mostrado precisos e acurados, como, por exemplo, a análise espermática computadorizada e a citometria de fluxo. No entanto, devido ao alto custo desses equipamentos, está longe de se tornar uma prática comum na medicina veterinária, ficando limitada a alguns centros de pesquisa.

Na espécie canina, bem como em outras espécies, os parâmetros *in vitro* nem sempre estão correlacionados à fertilidade *in vivo*. Desta forma, é necessária a realização de mais estudos que comparem os parâmetros *in vitro* com os resultados *in vivo*, na tentativa de determinar o parâmetro que melhor representa a real fertilidade do sêmen avaliado.

Referências

Amann, RP. Weaknesses in reports of “fertility” for horses and other species. *Theriogenology*, v.63, p.698–715, 2005.



- Amann, RP, Hammerstedt, RH.** In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, v.14, p.397-406, 1993.
- Brewis IA, Morton IE, Moore HD, England GCW.** Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.60, p.491-497, 2001.
- Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM.** Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, v.59, p.743-75, 2003.
- Casey PJ, Hillman RB, Robertson KR, Yudin AI, Liu IKM, Drobnis EZ.** Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J Androl*, v.14, 289-297, 1993.
- Cormier N, Bailey JL.** A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation. *Biol Reprod*, v.69, p.177-185, 2003.
- Christiansen IJ.** *Reprodução no cão e no gato.* São Paulo: Editora Manole, 1988.
- Dahlbom M, Andersson M, Vierula, M, Alanko M.** Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. *Theriogenology*, v.48, p.687-698, 1997.
- Douglas-Hamilton DH.** Validation procedures for the Hamilton Thorne Integrated Visual Optical System sperm and cell analyser. *Qual Assur*, v.4, p.340-347, 1995.
- Eilts BE.** Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, v.64, p.685-691, 2005.
- England GCW, Allen WE.** Evaluation of a cellulose acetate/nitrate filters for measuring the motility of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.88, p.369-374, 1990.
- England GCW, Plummer JM.** Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, n.47, p.261-270, 1993.
- Fazelli AR, Holt C, Steenweg W, Bevers MM, Holt WV, Colenbrander B.** Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. *Theriogenology*, v.44, p.17-27 1995.
- Fazelli AR, Steenweg W, Bevers M.M, Bracher, V, Parlevliet J, Colenbrander B.** Use of sperm binding to homologous hemizona pellucida to predict stallion fertility. *Equine Vet J Suppl*, v.15, p.57-59, 1993a.
- Fazelli AR, Steenweg W, Bevers MM, De Loos FAM, Van Den Broek J, Colenbrander B.** Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet Rec*, v.132, p.14-16, 1993b.
- Froman DP, Amann RP, Riek PM, Olar TT.** Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage. *J Reprod Fertil*, v.70, p.301-308, 1984.
- Garner DL, Hafez ESE.** Espermatozóides e plasma seminal In: Hafez ESE (Ed). *Reprodução animal.* São Paulo: Manole, 1995. p.167-190.
- Govette G, Linde-Forsberg C, Ström B.** A successful concept for freezing of dog semen. In: International Congress of Animal Reproduction, 13, 1996, Sydney. *Proceedings ... Sydney: ICAR, 1996.* v.2, p.5-8, (abstract).
- Graham JK.** Analysis of stallion sperm and its relation to fertility. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.119-130, 1996.
- Günzel-Apel AR, Günter C, Terhaer P, Bader H.** Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, n.47, p.271-278, 1993.
- Hammerstedt R, Graham J, Nolan J.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, v.11, p.73-88, 1990.
- Harrison RAP, Asworth PJC, Miller NGA.** Assessment of sperm function under fertilizing conditions. *Reprod Dom Anim*, v.31, p.25-30, 1996.
- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL.** Canine spermatozoa – cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, v.48, p.1329-1342, 1997.
- Hewitt DA, England GCW.** The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim Reprod Sci*, v.50, p.123-39, 1997.
- Hewitt DA, England GCW.** 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.
- Holt WV.** Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod Dom Anim*, v.31, p.17-24, 1996.
- Iguer-ouada M, Verstegen JP.** Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology*, v.55, p.1143-1158, 2001.
- Januskauskas A, Haard MG, Haard MCH, Söderquist L, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez, H.** Estimation of sperm viability in frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *J Vet Med Assoc*, v.43, p.281-287, 1996.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perz-Palaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD.** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, v.70, p.219-225, 1984.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Zaneveld LJD.** The hypoosmotic swelling test: An update. *Arch Androl*, v.29,

p.105-116, 1992.

Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.

Kaji K; Kudo, A. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction*, v.127, p.423-429, 2004.

Kawakami E, Kashiwagi C, Hori T, Tsutsui T. Effects of canine oviduct epithelial cells on movement and capacitation of homologous spermatozoa in vitro. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.121-31, 2001.

Kawakami E, Vandervoot C, Mahi-Brown CA, Overstreet JW. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biol Reprod*, v.48, p.841-845, 1993.

Keel BK, Webster BW. *Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*. Boston: CRC Press, 1990.

Kjaestad H, Ropstad E, Andersen Berg, K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet Scand*, v.34, p.299-303, 1993.

Kumi-Diaka J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v.39, p.1279-1289, 1993.

Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giewercman A. The Danish First Pregnancy Planner Study Team Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reprod*, v.15, p.1562-1567, 2000.

Larsson K, Einarsoon S, Nicander L. Influence of thawing diluents on viability, acrosome morphology, ultrastructure and enzyme release of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand*, v.17, p.83-100, 1976.

Mahadevan MM, Trounson AO. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fertil Steril*, v.41, p.287-293, 1984.

Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. p.13-14.

Mayenco-Aguirre AM, Pérez Cortés AB. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology*, v.50, p.195-204, 1998.

Mole JR, Fitzgerald JA. Comparison of ram semen sperm interaction with bovine cervical mucus. *Theriogenology*, v.33 (5), p.1031-1043, 1990.

Oetlé EE. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci*, v.12, p.145-150, 1986.

Oetlé EE. Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil Suppl*, n.47, p.257-260, 1993.

Oetlé EE, Soley JT. Infertility in a malttese poodle as a result of a sperm midpiece defect. *J S Afr Vet Assoc*, v.56, p.103-106, 1985.

Oetlé EE, Soley JT. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Vet Med Rev*, v.59, p.28-70, 1988.

Olar TT. *Cryopreservation of dog spermatozoa*. 1984. Thesis (PhD) - Colorado State University, Fort Collins, 1984.

Peña AI. *Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion-descongelacion*. 1997. 329f. Tese (Doutorado) - Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, 1997.

Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradón PG. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, v.50, p.163-174, 1998a.

Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradón PG. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology*, v.50, p.1211-1220, 1998b.

Peña AI. *Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity*. 2000. 86f. Thesis (Doctorat) - Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, 2000.

Peña Martínez AI. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.209-224, 2004.

Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel AR, Töpfer-Peterson E. Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous oviductal epithelial cells. *Reprod Dom Anim*, v.38, p.455-463, 2003.

Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel AR, Töpfer-Peterson E. Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct. *Theriogenology*, v.61, p.1617-1634, 2004.

Platz CC, Seager SWJ. Artificial insemination and frozen semen in the dog. *Vet Clin North Am*, v.7, p.757-764, 1977.

Purswell BJ, Lthouse GC, Root MV. Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. In: Annual Meeting of the Society for Theriogenology, 1992, Montgomery, AL. *Proceedings ...* Montgomery, AL: Society for Theriogenology, 1992. p.174-181.

Revel SG, Mrode RA. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci*, v.36, p.77-86, 1994.

Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Hoflack G, De Kruif A. Automated sperm morphometry and



- morphology analysis of canine semen by the Hamilton–Thorne analyser. *Theriogenology*, v.62, p.1292-1306, 2004.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, De Kruif A.** New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, v.64, p.706-719, 2005.
- Rodrigues BA.** *Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado.* 1997. 176f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL.** Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reprod Dom Anim*, v.38, p.58-62, 2003.
- Rodrigues BA, Santos LC, Rodrigues JL.** Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.67, p.215-223, 2004.
- Rodríguez-Gil JE, Monserrat A, Rigau, T.** Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*, v.42, p.815-829, 1994.
- Rodriguez-Martinez H, Ekwall H.** Quantitative energy x-ray microanalysis in biopsies of porcine myometrium after cryo-fixation. *J Ultrastr Mol Struct Res*, v.102, p 299, 1989.
- Rodriguez-Martinez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C.** Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, n.47, p. 279-85, 1993.
- Rota A, Iguer-Ouada M, Verstegen JP, Linde-Forsberg C.** Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, v.51, p.1045-1058, 1999a.
- Rota A, Peña AI, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H.** In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci*, v.57, p.199-215, 1999b.
- Sanchez-Partida LG, Windsor DP, Eppleston J, Setchell BP, Maxwell, WM.** Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *J Androl*, v.20, p.280-288, 1999.
- Seager SWJ, Fletcher WS.** Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet Rec*, v.92, p.6-10, 1972.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reprod Dom Anim*, v.41, p. 71-78, 2006.
- Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM.** Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, v.59, p.821-829, 2003.
- Spittaler PJ, Tyler JPP.** Further evaluation of a simple test for determining the integrity os spermatozoal membrane. *Clin Reprod Fertil*, v.3, p.187-190, 1985.
- Ström B.** *In vitro characterization of cryopreserved canine spermatozoa.* 1999. 104f. Thesis (Doctorat) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 1999.
- Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C.** In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.247-256, 1997.
- Ström Holst B, Larsson B, Rodriguez-Martinez H, Lagerstedt AS, Linde-Forsberg C.** Zona pellucida binding-assay: a method for evaluation of canine spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, v.57, p.137-140, 2001.
- Talbot TL, Chacon RS.** A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool*, v.215, p.201-208, 1981.
- Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V, Simkin ME, Foote RH.** Use of Hoechst 33324 stain to evaluate live fresh and frozen bull sperm by computer assisted analysis. *J Androl*, v.19, p.201-206, 1998.
- Tardif S, Laforest JP, Cormier N, Bailey JL.** The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, v.52, p.447-459, 1999.
-