

CRISTINE MESSIAS

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DO CÃO
APÓS DILUIÇÃO E RESFRIAMENTO

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo R. Weiss.

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz E. Kozicki.

CURITIBA

2000

AGRADECIMENTOS

Acredito que “Agradecimentos” seja a parte mais pessoal do trabalho, onde posso me expressar com maior liberdade.

Gostaria de agradecer a muitas pessoas que me acompanharam na pós-graduação, possibilitando-me a conclusão deste trabalho e também agradeço àqueles que estiveram comigo em todos os meus momentos de tragédia e comédia. Começo, então, pela parte acadêmico-científica:

Agradeço aos integrantes dos Cursos de Graduação e Pós-graduação da Universidade Federal do Paraná, com toda sua estrutura, corpo docente e funcionários.

Agradeço ao CNPq e CAPES, que me patrocinaram nesta empreitada.

Muito obrigada ao meu orientador Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss, e meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Hernandez Kozicki.

Obrigada a Prof. Suely Rodaski por me conceder os canis no Hospital Veterinário, pela colaboração em algumas partes do trabalho, contribuindo sempre de forma pertinente e direta, sendo sempre uma pessoa agradável ao convívio.

Agradeço ao Prof. Dr. Metry Bacila, meu professor no Mestrado e de meu pai na Faculdade de Medicina, pela vontade incondicional de ensinar, por sempre dizer que “isso é muito importante” valorizando e incentivando, desta forma, nossos trabalhos. Obrigada por nos tratar e respeitar, acima de tudo como pessoas e nos apoiar em momentos acadêmicos e pessoais em que já não acreditávamos ser possível seguir em frente.

Obrigada a Prof. Dr. Clotilde Branco Germiniani pela constante presença e esforços durante tantos anos atuando de várias formas em nosso curso e pelo incentivo dado em momentos difíceis pelos quais passei.

Agradeço aos funcionários do H.V. Sebastião e Marina por manterem a limpeza nos canis quando precisei. Obrigada a Tânia e Deleuse, Sr. Dorli, Dito, Bernardo, sempre trabalhando com eficiência na Secretaria e no Departamento de Medicina Veterinária. Obrigada especial ao Sr Francisco Gerber da Pós-graduação, sempre disposto a me ajudar com disquetes de computador rebeldes, documentos, papos e muita simpatia.

Obrigada a Prof. Dra. Anne Rose Günzel-Apel da Tierärztliche Hochschule Hannover por me enviar os trabalhos solicitados e que foram primordiais para minha tese.

Obrigada a minha professora de alemão predileta, Frau Isolde Menuzzo, do Goethe Institut de Curitiba, por auxiliar nas traduções dos trabalhos mandados pela Dra. Anne Rose...

Agradeço ao Prof. Paulo Bracarense do Depto. de Estatística da UFPR.

Obrigada à colega Rita Mangrich Rocha pelas dicas de pesquisa na Internet e aos meus outros colegas de Mestrado, uma das turmas mais engraçadas que já conheci.

Agora, vamos para a parte não tão acadêmica:

Agradeço de todo o coração àqueles que me deram o maior presente de todos (vida): meus pais Elaine e Dr. Messias, assim como minha irmã Joselaine. Essas pessoas foram e sempre serão a base para a minha vida e sempre me apoiaram e acreditaram em cada passo que dei, seguido ou não de sucesso.

Obrigada a Monica Correia do Amaral principalmente por ter acreditado em mim, quando falei que a reprodução de pequenos animais teria grande futuro em nosso país.

Obrigada ao meu amigo Nicolau Eduardo de Toledo, gênio dos computadores, pelo suporte técnico, muitos gráficos, tabelas, formatações, dicas, paciência e por dividir comigo algumas músicas dos seus arquivos de hard core.

Agradeço aos meus sempre e inseparáveis amigos do Alte Heimat: Betinha, Marcelinho, Carlos, Túlio e Denise, compartilhando o amor pela dança, ensaios, viagens, bagunças, Guaíras, crises, estresse e muitas gargalhadas no Schwarzwald.

Agradeço ao meu amigo e colega de Mestrado André Ostrenky pela presença constante, amizade, aulas de Bioquímica, pizzas, dicas de tese e por bancar meu guru, se preocupando sinceramente comigo.

Aos meus amigos Eduardo Santa Bárbara, Maurício Bially, Cris e Lauri Ratier, Letícia Baltazar um obrigada cheio de carinho. Foram muitos abraços, algumas lágrimas, esportes, poesias, cafés, risadas e ombros compartilhados.

Agradeço também aos meus cães de experimento Bono e Xuxu por se comportarem direitinho e contribuírem para a ciência sempre de bom humor. Obrigada aos outros cães Slater, Cafu, Asterix e Ludovico (amigão) e a muitos outros que conheci enquanto fazia a seleção de cães para o experimento, assim como a meus pets. Cada um deles me ensinou coisas que eu não poderia ter aprendido de outra maneira.

Agradeço a Deus por ter feito as pazes comigo (e eu com ele).

Por fim, agradeço aos desafios que apareceram pelo caminho sob diferentes formas e que me deixaram a clara certeza de que seguir é preciso, por mais difícil que seja, pois não existe vitória onde não houve algum tipo de luta.

Dedico este trabalho a meus pais.

Agradecimentos posteriores à última correção:

Paulo Rogerio Mangini (por ser, de várias formas e há muito tempo, importante na minha vida), Paulinha e Cláudio Mangini e à “mamãe” deles, Janete; Adri Fanta, Guigui e toda a família Holzmann Almeida; Bete, Sofia e Manoel Javorouski; Rogério Sech, Therezinha; George Ortmeier Velastin, Ricardo Vilani, Rodrigo de Souza, Cão, Cateto, Giba, Urubu, Cacau, Quejin, Jayme, Camilouca, Bianquinha, Petra, Val, Pachaly e Elza, Alinha e Mattias, Dra Günzel-Apel, todas as pessoas legais que conheci na Alemanha e aos meus “arrojados” sócios da Biositu.

Agradeço a todos por trazerem muitas coisas ótimas prá minha vida e me ajudarem a manter a “sanidade mental”. Ah, e obrigada à Seleção Brasileira de Voleibol Masculino de quadra, por trazerem finalmente o OURO OLÍMPICO de Atenas (brasileiro é bom mesmo!!!).

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Motilidade espermática e integridade do acrossoma como parâmetros na avaliação da qualidade do sêmen.....	2
2.2 Influência da secreção prostática sobre a motilidade espermática.....	3
2.3.1 <i>Influência do armazenamento sobre a motilidade espermática do sêmen canino não diluído.</i>	5
2.3.2 <i>Influência dos diluentes e do armazenamento sobre a motilidade do sêmen canino diluído.</i>	6
2.3.2.1 <i>Influência dos diluentes e do resfriamento sobre a motilidade e integridade do acrossoma do sêmen canino diluído.</i>	7
2.4 Conservação do sêmen em outras espécies.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Cães doadores de sêmen	11
3.2 Procedimento experimental.....	12
3.2.1 <i>Colheita do sêmen</i>	13
3.2.2 <i>Avaliação do sêmen</i>	14
3.2.2.1 Motilidade	14
3.2.2.2 Concentração.....	14
3.2.2.3 Morfologia espermática.....	15
3.3 Análise Estatística	15
4 RESULTADOS	16
4.1 Exames laboratoriais.....	16
4.1.1 <i>Influência dos diluentes e do tempo de conservação sobre o percentual de espermatozoides com motilidade progressiva.</i>	16
4.1.2 <i>Influência dos diluentes e do tempo de armazenamento sobre a integridade do acrossoma dos espermatozoides.</i>	23

4.1.3 <i>Evolução da motilidade progressiva no tempo</i>	29
5. DISCUSSÃO	33
5.1 Influência dos diluentes e do tempo de conservação sobre a motilidade progressiva dos espermatozóides.....	34
5.2 Influência dos diluentes e do tempo de conservação sobre a integridade do acrossoma.....	35
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES ¹	12
TABELA 2. GRAU DE DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA.....	13
TABELA 3. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E LEITE DESNATADO (DILUENTE B).	17
TABELA 4. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C).	19
TABELA 5. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM LEITE DESNATADO (DILUENTE B) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).	20

TABELA 6. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).....	22
TABELA 7. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E LEITE DESNATADO (DILUENTE B).	23
TABELA 8. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C)	25
TABELA 9. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM LEITE DESNATADO (DILUENTE B) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D)	26
TABELA 10. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).....	28
TABELA 11. PERCENTUAL DE MOTILIDADE PROGRESSIVA DE ESPERMATOZÓIDES DE SÊMEN CANINO NÃO DILUÍDO E COM UTILIZAÇÃO DOS DILUENTES A, B, C E D NO TEMPO.....	29
TABELA 12. TEMPO DECORRIDO ATÉ QUE A MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZÓIDES DE SÊMEN CANINO ATINJA 50%.....	30
TABELA 13. PERCENTUAL MÉDIO DE ACROSSOMAS INTACTOS NO SÊMEN CANINO DILUÍDO COM DIFERENTES DILUENTES NO PERÍODO DE 96 HORAS DE ARMAZENAMENTO A 5° C.	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E LEITE DESNATADO (DILUENTE B).	18
FIGURA 2. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E TRIS + SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C)	19
FIGURA 3. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM LEITE DESNATADO (DILUENTE B) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).	21
FIGURA 4. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).	22
FIGURA 5. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E LEITE DESNATADO (DILUENTE B)	24
FIGURA 6. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C)	25
FIGURA 7. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM LEITE DESNATADO (DILUENTE B) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).	27

FIGURA 8. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).....	28
FIGURA 9. PERCENTUAL DE MOTILIDADE PROGRESSIVA DE ESPERMATOZÓIDES DE SÊMEN CANINO NÃO DILUÍDO E COM UTILIZAÇÃO DOS DILUENTES A, B, C E D NO TEMPO.....	30
FIGURA 10. TEMPO DECORRIDO ATÉ QUE A MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZÓIDES DE SÊMEN CANINO ATINJA 50%.....	31
FIGURA 11. PERCENTUAL MÉDIO DE ACROSSOMAS INTACTOS NO SÊMEN CANINO DILUÍDO COM DIFERENTES DILUENTES NO PERÍODO DE 96 HORAS DE ARMAZENAMENTO A 5° C.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

C° = graus Celcius.

DMSO = Dimetilsulfóxido.

g = gramas

I.A. = Inseminação Artificial.

kg = quilogramas

m_{cg} = microgramas

mg = miligramas

ml = mililitros.

TRIS = Trihidroximetil-aminometano

UI = unidades internacionais

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de quatro diferentes diluentes na conservação do sêmen canino no decorrer de 96 horas de armazenamento a 5° C. Para o experimento foram selecionados dois cães sem raça definida, de mesma idade e porte. Foram colhidos 10 ejaculados de cada cão durante 5 semanas consecutivas, totalizando 20 ejaculados (10 ejaculados/cão). As amostras de sêmen obtidas foram diluídas em TRIS-gema, leite desnatado, TRIS-gema acrescido de secreção prostática e leite desnatado acrescido de secreção prostática. As amostras foram avaliadas antes das diluições, na hora zero (imediatamente após a diluição), 24, 48, 72 e 96 horas pós-resfriamento a 5° C. As amostras de sêmen não diluído foram avaliadas da mesma forma para comparação. Nas amostras de sêmen foram avaliadas motilidade progressiva e integridade dos acrossomas. Foram obtidos os seguintes resultados: 1. O diluente TRIS-gema mostrou-se superior ao diluente leite desnatado quanto à motilidade progressiva e semelhante quanto à integridade de acrossomas das células espermáticas no decorrer das 96 horas de experimento. 2. Os diluentes TRIS-gema e leite desnatado quando acrescidos de secreção prostática, sempre mostraram-se inferiores nos parâmetros motilidade progressiva e integridade dos acrossomas espermáticos ($p \leq 0,05$). 3. O tempo de viabilidade das células espermáticas que apresentou mínimo de 50% de motilidade progressiva dos referentes diluentes foi: TRIS-gema = 82,5 horas; leite desnatado = 60,7 horas; TRIS-gema+secreção prostática= 60,3; leite desnatado+secreção prostática=38,4 horas. 4. Os diluentes acrescidos de secreção prostática não apresentaram resultados satisfatórios na conservação do sêmen canino a 5° C.

Palavras Chave: Sêmen canino, resfriamento, diluentes.

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the efficiency of four different diluents on the conservation of canine semen at 5° C. For the experiment were selected two mixed breed dogs with the same age na body size. Ten ejaculates were collected of each dog troughout five weeks and the samples were diluted in TRIS-egg yolk, skim milk, TRIS-egg yolk in addition to prostatic fluid and skim milk in addition to prostatic fluid. The samples were evaluated before dilution; immediatelly after (time 0); 24; 48; 72 and 96 hours after cooling. The spermatological evaluation concerned progressive motility and acrosome integrity after dilution. The results were: 1. TRIS-egg yolk was superior to skim milk in relation to progressive motility during 96 hours of experiment, and as good as in relation to acrosome integrity. 2. The diluents TRIS-egg yolk and skim milk when in addition to prostatic secretion were always inferior in relation to progressive motility and acrosome integrity. 3. Time of viability of semen whit at least 50% of progressive motility was: TRIS-egg yolk= 82.5 hours; skim milk= 60.7 hours; TRIS-egg yolk+prostatis fluid= 60.3 hours, skim milk+prostatic fluid= 38.4 hours. 4. The two diluents in addition to prostatic fluid do not showed good results for canine semen cooling at 5° C.

Key words: Canine semen, cooling, diluents.

1. INTRODUÇÃO

A criação de cães vem crescendo muito nos últimos anos. Vários países europeus e os Estados Unidos da América estão investindo no desenvolvimento e aperfeiçoamento, por meio de seleção, de várias raças existentes atualmente. Com isso, surgiram reprodutores de alto padrão genético que deverão ser mais bem utilizados pelo uso de biotécnicas da reprodução, principalmente pela criopreservação do sêmen e inseminação artificial.

Para aumentar a eficiência dessa tecnologia, estão sendo realizadas pesquisas com o objetivo de desenvolver meios diluidores de sêmen que garantam a viabilidade da célula espermática nos processos de resfriamento e criopreservação.

O congelamento do sêmen garante sua capacidade fecundante por tempo indeterminado até o presente momento, o que é bastante desejável no intercâmbio internacional de material genético, inclusive de reprodutores já mortos. Entretanto, nem todos os reprodutores possuem sêmen com características ideais para congelamento (GÜNZEL, 1986), fazendo-se necessário o seu resfriamento e possibilitando, dessa forma, seu transporte para inseminação de fêmeas localizadas a longas distâncias.

De acordo com a pesquisa de GÜNZEL e KRAUSE (1986), a fertilidade do sêmen diluído mantém-se no máximo por 72 horas, desde sua colheita até a inseminação artificial. Na exportação de sêmen resfriado os transtornos decorrentes de imprevistos muitas vezes fazem com que esse tempo seja insuficiente para a adequada utilização do mesmo. Com isto faz-se necessário desenvolver meios diluidores melhores para a conservação do sêmen a 5 °C, garantindo boa motilidade e integridade de acrossoma por período de tempo mais longo.

A pesquisa de Mcconnel *et al.* (1987) revelou que a motilidade espermática é dependente da fonte energética mitocondrial ATP (trifosfato de adenosina) e Frenette *et al.* (1986) verificaram que a fosfatase ácida é sintetizada pela próstata e a alcalina pela cauda do epidídimo e ducto deferente. Entretanto, a maioria do plasma seminal do cão é oriundo da próstata (Miller *et al.*, 1979).

O objetivo do presente trabalho consiste em avaliar e comparar a conservação do sêmen canino a 5°C com quatro diferentes diluentes, sendo dois deles adicionados de secreção prostática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Motilidade espermática e integridade do acrossoma como parâmetros na avaliação da qualidade do sêmen.

A motilidade das células espermáticas é usada como parâmetro na avaliação da qualidade do sêmen servindo, inclusive, para avaliar a aptidão de um diluente quando de sua utilização na conservação do sêmen. Para que as células espermáticas consigam atravessar a zona pelúcida do óvulo no momento da fecundação é necessário que elas tenham boa motilidade e acrossomas íntegros (MAHI e YANAGIMACHI, 1978).

A capacidade de fecundação de espermatozoides de touro no sêmen diluído e congelado é mais relacionada à integridade dos acrossomas do que à motilidade (SAACKE e WHITE, 1972). Devido a esse fato (de que os espermatozoides com alterações acrossomais também apresentam boa motilidade), os dois parâmetros devem ser observados (SAACKE e WHITE, 1972; MAHI e YANAGIMACHI, 1978).

O armazenamento do sêmen a baixas temperaturas acarreta variadas alterações nas membranas dos espermatozoides, principalmente no acrossoma (ou capuchão cefálico), o que se assemelha ao processo de reação do

acrossoma. Por esse motivo a observação da integridade do acrossoma é fundamental quando se faz necessária a conservação do sêmen.

Em sêmen de coelho foi encontrada correlação significativa entre integridade acrossomal e os resultados de fertilização que foram objetivados, mas a correlação não foi significativa entre fertilização e motilidade espermática (HELLEMANN, 1976; WEITZE, 1977).

No cão foi encontrada relação entre motilidade espermática e integridade acrossomal no sêmen fresco não diluído, o que não foi observado em amostras de sêmen diluído e congelado (OETTLE, 1986).

PACE *et al.* (1981), estudando sêmen bovino, observaram correlação positiva entre fertilidade e atividade da acrosina e foi observada em sêmen canino fresco, diluído e congelado a correlação positiva entre fertilidade e integridade acrossomal (FROMAN *et al.*, 1984). Essa correlação só foi parcialmente confirmada pois, aparentemente, não é possível analisar todos os graus de defeitos acrossomais por exames utilizando contraste de fase (HUWER, 1984).

2.2. Influência da secreção prostática sobre a motilidade espermática

A dependência da motilidade espermática da fonte de energia ATP (trifosfato de adenosina) é largamente conhecida e descrita em várias espécies (Multamäki *et al.*, 1980; CALAMERA *et al.*, 1982, 1986; COMHAIRE *et al.*, 1983; YOUNG e SMITHWICK, 1983; SÖDERQUIST e LARSON, 1985; MCCONNEL *et al.*, 1987), sendo que trabalhos de BRACKETT e WILLIAMS (1967) e KÄHN (1981) contribuíram na determinação da concentração de ATP no sêmen canino.

A liberação de energia pela desfosforilação do ATP é catalizada pela adenosina trifosfatase (ATPase), que se encontra na peça intermediária do espermatozóide. Das inúmeras fosfatases encontradas no plasma seminal foram encontradas duas monofosfoesterases e seu local de produção foi determinado por MANN (1964) ; a fosfatase ácida é sintetizada pela próstata e a fosfatase

alcalina pelo epidídimo e pelos ductos deferentes (HEITE e WETTAUER, 1979; FRENETTE *et al.*, 1986).

SMITH (1975) e MILLER (1979) verificaram que o volume do plasma seminal do ejaculado do cão é, quase que em sua totalidade, fornecido pela próstata, o que vem de encontro com resultados obtidos por ENGLAND e ALLEN (1990), quando também observaram que a primeira e a terceira frações seminais do ejaculado do cão são produzidas pela próstata, observando efeitos deletérios à célula espermática quando as mesmas foram diluídas nessas frações.

GÜNZEL e EKROD (1991) observaram que o aumento da motilidade individual das células espermáticas com adição de secreção prostática foi temporária e que houve ainda maior redução dessa motilidade após 24 horas de diluição e resfriamento, se comparada com outros meios diluidores.

GÜNZEL e EKROD (1991) observaram redução na motilidade e na concentração de ATP em amostras de sêmen canino não diluídas e nas diluídas com secreção prostática quando comparadas com amostras diluídas em TRIS-gema.

A utilização da secreção prostática no congelamento do sêmen canino, da mesma forma que no resfriamento, também é alvo de estudos. Em temperatura de congelamento de -18° C, NOTHLING *et al.* (1995) obtiveram maiores taxas de prenhez nos dois grupos de fêmeas inseminadas intra-uterinamente com adição de 3 a 10 ml de secreção prostática, comparando-se com o grupo inseminado sem secreção.

Conservação do sêmen canino

A primeira inseminação artificial (I.A.) na espécie canina foi realizada com sucesso na Itália por Lazzaro Spallanzani em 1780 (MIES FILHO, 1978). A seguir o russo Ivanov prosseguiu com estudos que demonstraram a possibilidade de fertilização de fêmeas com utilização de soros artificiais substituindo líquidos orgânicos produzidos pelas glândulas anexas. Esse mesmo pesquisador

esclareceu a dinâmica do uso de baixas temperaturas na conservação do sêmen para I.A., inseminando fêmeas eqüinas (MIES FILHO,1978).

No entanto, somente após 1950 é que essa tecnologia começou a despertar mais o interesse dos pesquisadores. HARROP (1961) descreveu a utilização de sêmen canino fresco e também diluído e resfriado na I.A. que, após ser transportado durante seis dias, resultou em gestação de uma cadela.

A primeira publicação relatando o sucesso da I.A. com sêmen canino congelado foi feita por SEAGER (1969). A pesquisa de LINDE-FORSBERG (1995) revelou que os diluidores de sêmen auxiliam na proteção das membranas celulares dos espermatozóides, são fontes de energia, estabilizam o pH e a pressão osmótica e que a técnica de resfriamento do sêmen leva a decréscimo da taxa metabólica espermática, aumentando a longevidade das células.

2.3.1 Influência do armazenamento sobre a motilidade espermática do sêmen canino não diluído.

Durante o armazenamento do sêmen canino fresco a 5° C por 24 horas, foi constatado que a motilidade progressiva foi de 74% para 40% e, após 72 horas, decresce ainda mais, chegando a valores de 8,4% (GÜNZEL, 1986). Esse fato foi confirmado por EKROD (1989) e GÜNZEL-APEL e EKROD (1991) ao observarem perda de motilidade progressiva dos espermatozóides após 24 horas de armazenamento a 5°C.

Observações similares foram feitas por MORTON e BRUCE (1989), quando verificaram espermatozóides com motilidade praticamente nula após 96 horas de armazenamento sob a mesma temperatura.

Da mesma forma que ocorrem alterações celulares no armazenamento a baixas temperaturas, a conservação do sêmen não diluído a 35° C durante 1 hora levou à imobilidade dos espermatozóides e à alterações morfológicas, ainda

sendo constatado que a conservação a 7° C durante 1 hora não acarretou maiores alterações (YUBI *et al.*, 1987).

2.3.2 Influência dos diluentes e do armazenamento sobre a motilidade do sêmen canino diluído.

Com o acréscimo de meios diluidores o sêmen conserva suas características por mais tempo. Após 72 horas de armazenamento a 5° C foi observada queda na motilidade em 66% nas amostras de sêmen canino fresco não diluído, enquanto que em amostras de sêmen diluído a queda foi de apenas 20% (GÜNZEL, 1986).

A adição de diluente TRIS-gema-lactose propiciou aumento da síntese mitocondrial de ATP, favorecendo a manutenção da motilidade, apresentando 60% de espermatozoides móveis após 24 horas de resfriamento a 5° C (EKROD, 1989; GÜNZEL-APEL e EKROD, 1991).

Com utilização de leite desnatado e gema de ovo diluídos na proporção de 1:8 obteve-se 50% de motilidade após 9 dias de armazenamento a 4° C (HARROP, 1961). Após 72 horas, melhores resultados de motilidade foram obtidos com TRIS em comparação com diluentes contendo leite desnatado e citrato (ROYCHOUDHURY e DUBAY, 1974).

BOUCHARD *et al.* (1990) observaram que amostras de sêmen diluídas em leite desnatado e conservadas a 4° C apresentaram motilidade progressiva superior quando comparadas com amostras mantidas a 22 e 37° C. Em 120 horas de armazenamento o diluidor glicose-leite desnatado possibilitou melhor motilidade do que o meio citrato-gema (PROVINCE *et al.*, 1984).

2.3.2.1 *Influência dos diluentes e do resfriamento sobre a motilidade e integridade do acrossoma do sêmen canino diluído.*

KOBER (1985) diluiu sêmen de cães da raça Schnauzer gigante e obteve resultados superiores de motilidade progressiva nas amostras diluídas em citrato de sódio quando comparadas com amostras diluídas em TRIS (com e sem adição de glicerol).

GÜNZEL (1986) conduziu um estudo comparativo entre amostras de sêmen canino não diluído e diluído em meio TRIS armazenadas a 5°C, observando a superioridade do sêmen diluído. BOUCHARD *et al.* (1990) compararam sêmen canino diluído com citrato-gema e leite desnatado-glicose, sendo que a motilidade espermática foi superior com o primeiro diluente.

GÜNZEL e EKROD (1991) compararam amostras de sêmen canino não diluído com amostras diluídas em secreção prostática ou meio TRIS-gema, observando redução na motilidade e na concentração de ATP nas amostras não diluídas e nas diluídas com secreção prostática.

A atividade da fosfatase ácida aumentou nas amostras contendo secreção prostática, mas diminuiu nas amostras diluídas em TRIS. A atividade da fosfatase alcalina diminuiu, tanto nas amostras adicionadas de secreção prostática quanto naquelas diluídas em TRIS.

MÜLLER (1992) comparou sêmen canino não diluído com sêmen diluído em TRIS-gema e leite desnatado e os mesmos diluentes com adição de albumina sérica bovina (BSA), observando que amostras diluídas apresentaram menor índice de alterações acrossomais.

Uma das características da membrana das células espermáticas é o transporte ativo de moléculas. Em condições de hipoosmolaridade, ocorre influxo de água para o interior das células objetivando equilíbrio osmótico, o que leva à aumento do volume celular e deformações da membrana plasmática. KUMI-DIAKA (1993) observou correlação positiva e significativa entre os testes hipoosmóticos

e motilidade, constatando que, em condições hipoosmóticas, ocorre edemaciação da cauda das células espermáticas, ocasionando alteração de motilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por RODRIGUEZ *et al.* (1994), bem como INAMASSU *et al.* (1999) constataram dobramento das caudas dos espermatozóides submetidos às mesmas condições.

A utilização de secreção prostática e do plasma seminal na diluição de sêmen canino também é considerada. ROTA *et al.* (1995) desenvolveram um estudo da diluição do sêmen em plasma seminal, TRIS-gema e leite-gema, armazenando as amostras a 4°C, observando que a diluição em plasma seminal resultou em maior índice de espermatozóides deformados, apresentando motilidade nula em 24 horas enquanto que a motilidade e o vigor espermáticos foram maiores em amostras diluídas em TRIS-gema.

ENGLAND e PONZIO (1996) pesquisaram a utilização de TRIS-gema no resfriamento e congelamento de sêmen canino, sendo que as amostras de sêmen resfriado apresentaram motilidade superior às amostras de sêmen congelado, indicando que a técnica de resfriamento é mais recomendada do que a de congelamento em situações em que o sêmen em questão será utilizado dentro do período de quatro a cinco dias.

2.4 Conservação do sêmen em outras espécies

As biotécnicas da reprodução como resfriamento, congelamento de sêmen e inseminação artificial são utilizadas há bastante tempo em outras espécies animais, principalmente nas espécies de maior interesse comercial. Muitas das técnicas e meios diluidores utilizados na conservação de sêmen ovino, bovino, suíno e eqüino passaram a ser utilizados na conservação do sêmen do cão e de outros animais domésticos e selvagens.

No resfriamento de sêmen ovino JONES e MARTIN (1973) concluíram que a utilização de solução de tampão fosfatado-glicose prejudicou a motilidade

espermática e integridade dos acrossomas. Entretanto, os efeitos deletérios diminuíram com a inclusão de 3% de gema de ovo ao diluente.

WATSON e MARTIN (1975) obtiveram bons resultados com gema na concentração de 1,5% durante resfriamento ou congelamento do sêmen ovino. A presença de glicerol no diluente aumentou o tempo de vida dos espermatozóides, mas altas concentrações do mesmo produziram significativa alteração dos acrossomas.

TIWARI *et al.* (1977) observaram alta mortalidade de células espermáticas quando utilizaram somente leite como meio diluidor do sêmen ovino armazenado a 5° C, fato ocorrido devido ao acúmulo de ácido láctico nas amostras conseqüente à queda do pH.

DEKA e RAO (1980) observaram a superioridade dos diluentes TRIS-glicose e leite integral em relação ao citrato no armazenamento do sêmen a 5°C, concluindo que as macromoléculas das proteínas do leite preservaram as características biológicas dos espermatozóides expostos a baixas temperaturas.

SOYLU *et al.* (1991) observaram altas taxas de concepção em fêmeas ovinas inseminadas com o diluente glicose-fosfato e adição de α -quimiotripsina, observando ainda boas taxas de fertilidade quando adicionada vitamina E ao mesmo diluente.

GUERRA e NUNES (1999) observaram que diluentes à base de água de côco adicionados de glicerol e gema de ovo preservaram a viabilidade das células espermáticas ovinas mantidas a 4° C durante 72 horas. A água de côco também foi utilizada com sucesso na diluição de sêmen caprino e foi constatado que o ácido indolacético presente nessa substância atua como crioprotetor da célula espermática (NUNES,1993).

A espécie bovina sempre foi alvo de grande número de pesquisas na área de biotecnologia da reprodução e vários tipos de diluentes já foram criados e testados. O mel foi utilizado em um trabalho de RAMADAS *et al.* (1979), quando foi criada uma solução contendo mel, bicarbonato de sódio e gema de ovo,

obtendo melhora na qualidade do sêmen bovino e bubalino no resfriamento a 5° C.

Amostras de sêmen de touro diluídas em gema de ovo (10, 20 ou 30%) e leite em pó não apresentaram diferenças significativas em relação à motilidade e morfologia celulares, quando armazenadas a 5°C durante 144 horas (AK-K e ILERI-IK-a,1991). Entretanto observou-se que concentrações de 9% de leite em pó apresentaram melhor motilidade progressiva e menor percentagem de espermatozóides anormais quando comparadas com concentrações de 7 e 11 % (AK-K e ILERI-IK b,1991).

O resfriamento e o congelamento do sêmen reduzem o metabolismo espermático, diminuindo a produção de catabólitos e a peroxidação de lipídeos da membrana espermática, aumentando a vida útil dessas células (AMMAN e GRAHAM, 1992).

No congelamento de sêmen caprino MIES FILHO e SOUZA (1986) obtiveram melhores resultados quando retiraram o plasma seminal das amostras de sêmen a serem criopreservadas. ANDRADE *et al.* (1999) observaram melhores resultados no congelamento do sêmen caprino com a centrifugação do mesmo antes da criopreservação; observaram ainda que o diluidor TRIS-frutose-gema proporcionou resultados superiores ao diluidor glicose-glicerol-leite desnatado.

A remoção do plasma seminal antes do congelamento do sêmen caprino diluído em gema de ovo resultou em queda da motilidade progressiva dos espermatozóides após o descongelamento (TULI e HOLTZ,1994).

Na espécie eqüina KOBBER (1985) obteve melhores resultados de motilidade progressiva com utilização de diluente composto de leite desnatado quando comparadas com amostras diluídas em glicose-gema.

HARRISON *et al.* (1978) descreveu a grande sensibilidade do sêmen suíno às baixas temperaturas, utilizando diluentes salinos e macromoleculares no processo de resfriamento a 16°C. NASCIMENTO *et al.* (1999) concluíram que o sêmen suíno preservado em diluente de mínima contaminação contendo leite preservou melhor a morfologia e motilidade dos espermatozóides armazenados a

16° C do que a 5° C, embora em ambos os casos tenha ocorrido edema de acrossoma, o que comprometeu a capacidade fecundante das células.

Em congelamento de sêmen de elefante africano (*Loxodonta africana*), JONES (1973) obteve melhores resultados de motilidade progressiva com utilização do diluente citrato-gema, adicionado de 7% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1% de glicerol.

Do mesmo modo, MERKT *et al.* (1990) obtiveram resultados de motilidade superiores no congelamento de sêmen de camelo utilizando citrato-gema em relação ao diluente leite magro.

Em amostras congeladas de sêmen de coelho foram observadas taxas decrescentes de lise total de acrossomas à medida que se aumentou a concentração de DMSO no diluente, com concentração máxima de DMSO igual a doadores 4 %. Esse resultado vem de encontro com resultados obtidos por HARRIS *et al.* (1973), quando obtiveram baixas taxas de defeitos acrossomais em sêmen congelado de galo, usando 8 % de DMSO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cães doadores de sêmen

Foram utilizados como doadores de sêmen dois cães sem raça definida (SRD) com aproximadamente três anos de idade e de porte médio, provenientes do Canil Municipal da Prefeitura de Curitiba. Os animais foram mantidos em canis individuais nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. A alimentação se consistiu de ração comercial (composição em Anexos), sendo que a quantidade a ser ingerida foi calculada de acordo com o peso corporal dos animais e a água foi servida à vontade.

Os cães foram submetidos a avaliação física de saúde geral, vacinados e vermifugados antes do início do experimento. Cada cão recebeu uma dose de vacina anti-rábica e uma dose de vacina óctupla (Laboratório Pfizer), por via

subcutânea. Para vermifugação, foi utilizada combinação de pirantel e praziquantel em dose de 5 mg/kg, por via oral.

3.2 Procedimento experimental

O procedimento experimental teve duração de 5 semanas, com início no começo de novembro de 1998. Após colheita do sêmen, a primeira e segunda frações seminais juntas foram divididas em 5 partes iguais em tubos de ensaio pré-aquecidos e mantidos à temperatura ambiente (15-25°C), sendo que 4 partes foram diluídas e uma parte foi utilizada para avaliação do sêmen não diluído (controle).

Como diluente A foi utilizado o TRIS-gema; leite desnatado em pó foi utilizado como diluente B. Foi feita pré-diluição dos meios TRIS-gema e leite desnatado com secreção prostática, na proporção 1:1. Com essa pré-diluição foram obtidos os diluentes C (TRIS-gema+secreção prostática) e D (leite desnatado + secreção prostática). Os diluentes utilizados, bem como sua composição, são demonstrados na TABELA 1.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES¹.

Amostra de sêmen fresco	Diluente	Composição
I	A	TRIS-gema
II	B	Leite desnatado
III	C	TRIS-gema+secreção prostática
IV	D	Leite desnatado+secreção prostática

¹ Avaliação feita em 0/24/48/72/96 horas.

O procedimento de diluição ocorreu a 37° C e as amostras de sêmen foram diluídas de acordo com a Tabela 2, com utilização dos quatro diluentes, sendo que as mesmas foram comparadas diretamente entre si.

Após 10 minutos de adaptação das células espermáticas aos respectivos diluentes, as amostras de sêmen diluído e não diluído (controle) passaram por uma primeira avaliação (hora zero). Depois foram mergulhadas em água fria (15° C) durante 10 minutos. Após esse período, as amostras ainda mergulhadas em água fria, foram colocadas em geladeira, onde alcançaram 5° C.

As amostras diluídas e a não diluída foram avaliadas também após 24/ 48/ 72/ 96 horas de conservação a 5°C. O volume de cada amostra variou de 0,2 a 0,5 ml, de acordo com a concentração espermática do ejaculado.

TABELA 2. GRAU DE DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA.

CONCENTRAÇÃO	PROPORÇÃO DA DILUIÇÃO
0,3 até $0,5 \times 10^6/\text{mm}^3$	1+3
0,5 até $0,8 \times 10^6/\text{mm}^3$	1+4
Acima de $0,8 \times 10^6/\text{mm}^3$	1+5

3.2.1 Colheita do sêmen

O sêmen foi colhido duas vezes por semana por meio da técnica de massagem peniana, com intervalo de 3 dias entre as colheitas, com auxílio de funil de vidro e tubo de ensaio graduado de 10 ml. A colheita da primeira e segunda fases do ejaculado foi feita em tubo de ensaio graduado pré-aquecido (37°C), bem como a terceira fração (secreção da próstata), que foi colhida em um segundo tubo de ensaio aquecido previamente.

3.2.2 Avaliação do sêmen

As amostras de sêmen foram avaliadas quanto à motilidade, concentração espermática e morfologia de acrossoma.

3.2.2.1 Motilidade

Foi observada a porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva como parâmetro para avaliar a qualidade do ejaculado. A determinação da motilidade progressiva foi feita em microscópio com contraste de fase (aumento de 400 vezes), com as amostras de sêmen a temperatura de 38° C (banho-maria). Para isso foi utilizada uma gota de sêmen (5 µL) entre lâmina e lamínula previamente aquecidas, sendo a avaliação feita numa escala de 5% (KRAUSE,1965).

3.2.2.2 Concentração

A determinação da concentração espermática do ejaculado foi realizada em câmara de contagem Thoma "neu", de acordo com a técnica descrita por KRAUSE (1966).

O conhecimento da concentração espermática nesse estudo teve por objetivo possibilitar o cálculo das diluições das amostras de sêmen nos quatro diluentes. Por este motivo, os valores das concentrações não serão demonstrados neste trabalho.

3.3.2.3 Morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia de acrossoma foram adicionadas 4 gotas de sêmen em 0,3 ml de solução de formol-salina (SCHEID,1980) (Anexos).

As lâminas foram preparadas colocando-se uma gota do sêmen diluído em formol salina entre lâmina e lamínula, fixadas nas laterais por esmalte incolor, sendo avaliadas 200 células espermáticas por lâmina com relação à integridade do acrossoma, utilizando-se microscópio de contraste de fase (1000 X) e observando-se os parâmetros (SYVÄRI,1984):

- a) Bordo apical normal;
- b) Bordo apical edemaciado;
- c) Acrossoma em desprendimento;
- d) Acrossoma desprendido;
- e) Bordo apical deformado.

Todas as células que apresentaram uma ou mais das alterações supra citadas foram consideradas inadequadas para a fertilização. Neste estudo, essas alterações não foram consideradas isoladamente. Desse modo, elas não aparecem discriminadas; considerou-se presença ou ausência de modificações na morfologia dos acrossomas.

3.3 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná em três etapas:

Etapa 1. Verificação da existência de diferença entre os valores de motilidade progressiva para os diferentes diluentes, com análise de variância em blocos.

Etapa 2. Verificação da existência de diferença entre os diluentes para os diferentes tempos, sendo realizada análise de variância em parcelas subdivididas no tempo. As comparações múltiplas foram feitas através do Teste de Tukey.

Etapa 3. Determinação dos tempos para atingir motilidade progressiva de 50%. As decisões foram tomadas com base em nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Exames laboratoriais

Para interpretação dos resultados foi determinada a média do percentual de motilidade progressiva e a média dos espermatozóides com acrossomas intactos nas amostras de sêmen dos dois cães, cujos resultados estão apresentados nas Figuras 1 a 11.

As Tabelas 2 a 13 demonstram a média e o desvio padrão dos dois parâmetros avaliados. Os níveis de significância das diferenças entre as médias serão considerados como segue:

* $p \leq 0,05$ = significativo.

** $p \leq 0,01$ = altamente significativo.

NS = não significativo.

4.1.1 Influência dos diluentes e do tempo de conservação sobre o percentual de espermatozóides com motilidade progressiva.

No decorrer do experimento houve redução progressiva na motilidade dos espermatozóides com utilização de todos os diluentes.

Comparação 1: Comparação entre os diluentes TRIS-gema (diluyente A) e leite desnatado (diluyente B).

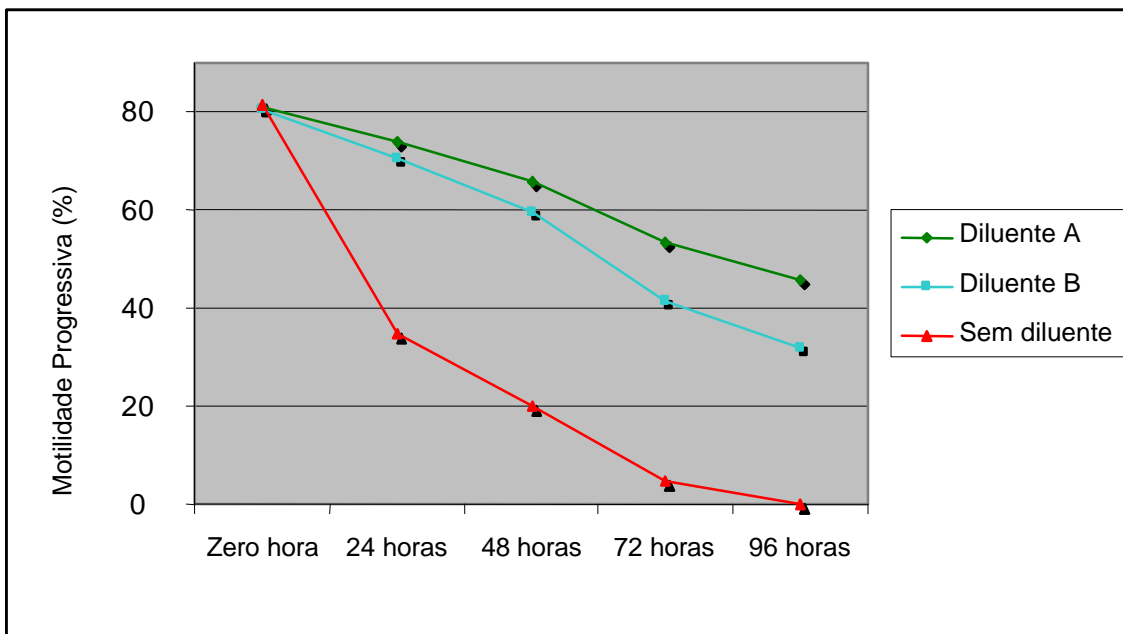
Nas Tabela 3 e Figura 1 podemos observar que, nas primeiras 24 horas de conservação do sêmen, a queda na motilidade progressiva nos dois diluentes foi pequena, sem diferença significativa. Entretanto, em 48, 72 e 96 horas de conservação, a motilidade progressiva no diluyente A (TRIS-gema) foi superior ao diluyente B (leite desnatado), com $p \leq 0,05$.

TABELA 3. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E LEITE DESNATADO (DILUENTE B).

	Percentual de motilidade média a cada 24 horas				
	Zero hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Diluyente A	81,0 ± 4,6 ^{NS}	74,0 ± 5,7*	65,5 ± 7,2*	53,5 ± 9,1*	45,5 ± 6,4*
Diluyente B	80,5 ± 3,7 ^{NS}	70,5 ± 5,0*	59,5 ± 5,0*	41,5 ± 12,0*	32,0 ± 3,5*
Sem diluyente	81,5 ± 4,1 ^{NS}	35,0 ± 4,7*	20,0 ± 4,1*	5,0 ± 2,4*	0,0 ± 0,0*

*= $p \leq 0,05$ (significativo); ^{NS} (não significativo).

FIGURA 1. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E LEITE DESNATADO (DILUENTE B).



Comparação 2: Comparação entre os diluentes TRIS-gema (diluente A) e TRIS-gema+ secreção prostática (diluente C).

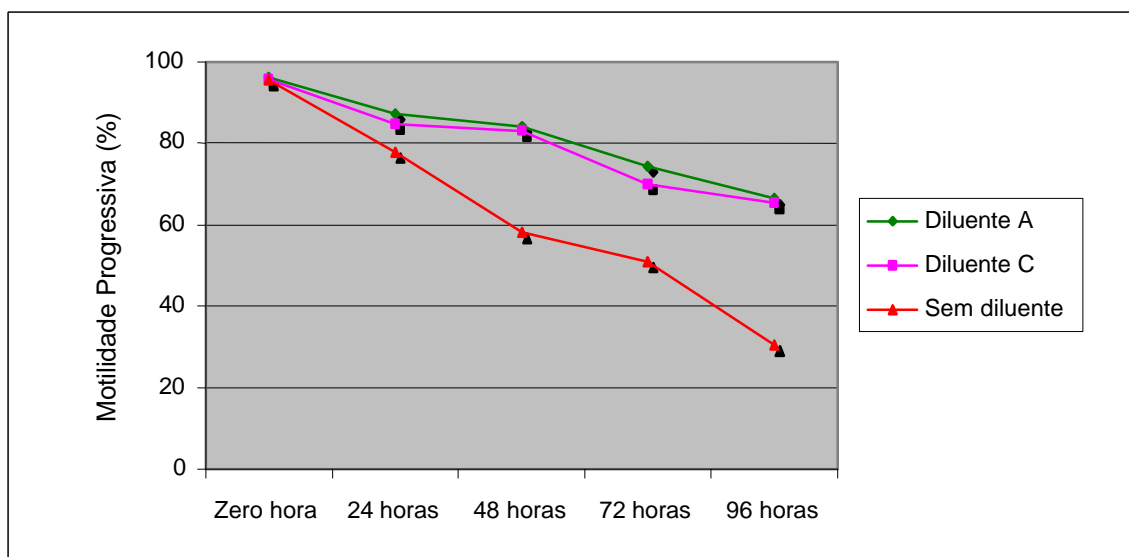
Observamos nas Tabela 4 e Figura 2 que, após a diluição, a motilidade progressiva apresentada pelas células espermáticas no diluente C durante conservação de 24 e 48 horas foi inferior ao diluente A, sendo a diferença não significativa. A partir das 72 e 96 horas de armazenamento, a motilidade progressiva no diluente A foi superior ($p \leq 0,05$ - $p \leq 0,01$).

TABELA 4. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C).

	Percentual de motilidade média a cada 24 horas				
	Zero hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Diluyente A	81,0 ± 4,6 ^{NS}	74,0 ± 5,7 ^{NS}	65,5 ± 7,2 ^{NS}	53,5 ± 9,1*	45,5 ± 6,4**
Diluyente C	81,5 ± 5,3 ^{NS}	66,0 ± 10,8 ^{NS}	61,5 ± 13,8 ^{NS}	39,0 ± 12,0*	22,0 ± 16,2**
Sem diluyente	81,5 ± 4,1 ^{NS}	35,0 ± 4,7 ^{NS}	20,0 ± 4,1 ^{NS}	5,0 ± 2,4*	0,0 ± 0,0**

= p ≤ 0,05 (significativo); ^{NS} (não significativo); **= p ≤ 0,01 (altamente significativo)

FIGURA 2. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E TRIS + SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C)



Comparação 3: Comparação entre os diluentes leite desnatado (diluyente B) e leite desnatado + secreção prostática (diluyente D).

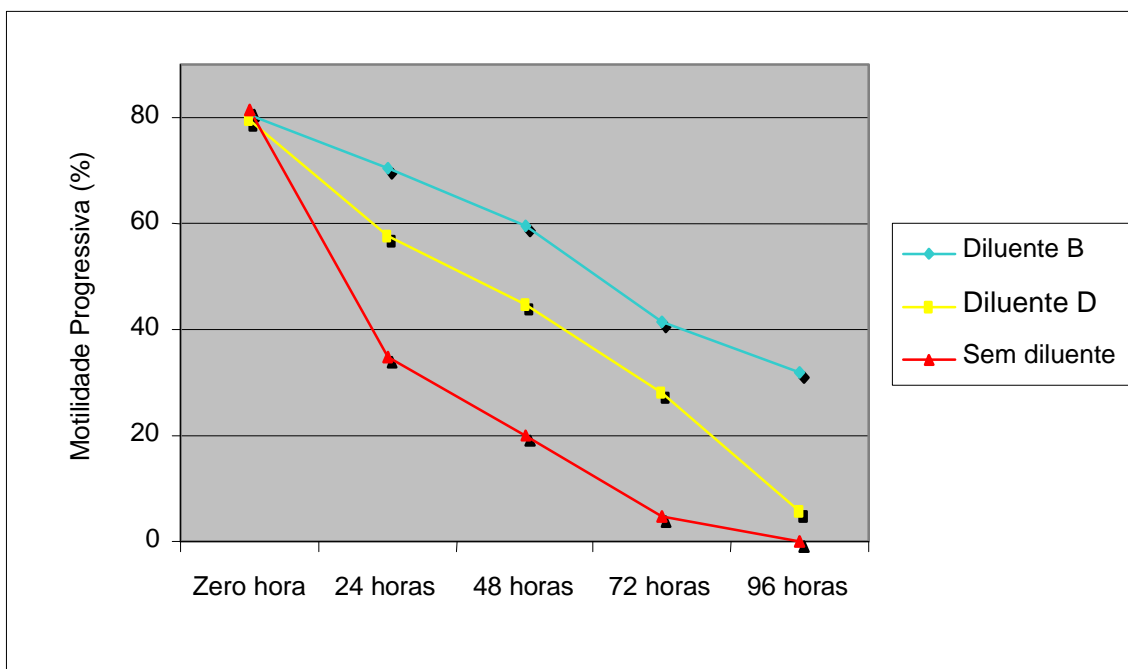
Inicialmente ambos os diluentes mantiveram a mesma motilidade. Após 24, 48 e 96 horas de armazenamento, a motilidade progressiva apresentada pelos espermatozoides das amostras do diluyente B foi significativamente maior que com utilização do diluyente D. Esta redução de motilidade foi altamente significativa após 96 horas, como demonstram a Tabela 5 e Figura 3.

TABELA 5. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM LEITE DESNATADO (DILUENTE B) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).

Percentual de motilidade média a cada 24 horas					
	Zero hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Diluyente B	80,5 ± 3,7 ^{NS}	70,5 ± 5,0*	59,5 ± 5,0*	41,5 ± 12,0*	32,0 ± 3,5**
Diluyente D	79,5 ± 3,7 ^{NS}	57,5 ± 16,2*	45,0 ± 13,1*	28,0 ± 7,5*	5,5 ± 1,6**
Sem diluyente	81,5 ± 4,1 ^{NS}	35,0 ± 4,7*	20,0 ± 4,1*	5,0 ± 2,4*	0,0 ± 0,0**

= p ≤ 0,05 (significativo); ^{NS} (não significativo); **= p ≤ 0,01 (altamente significativo).

FIGURA 3. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM LEITE DESNATADO (DILUENTE B) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).



Comparação 4: Comparação entre os diluentes TRIS-gema + secreção prostática (diluente C) e leite desnatado+ secreção prostática (diluente D).

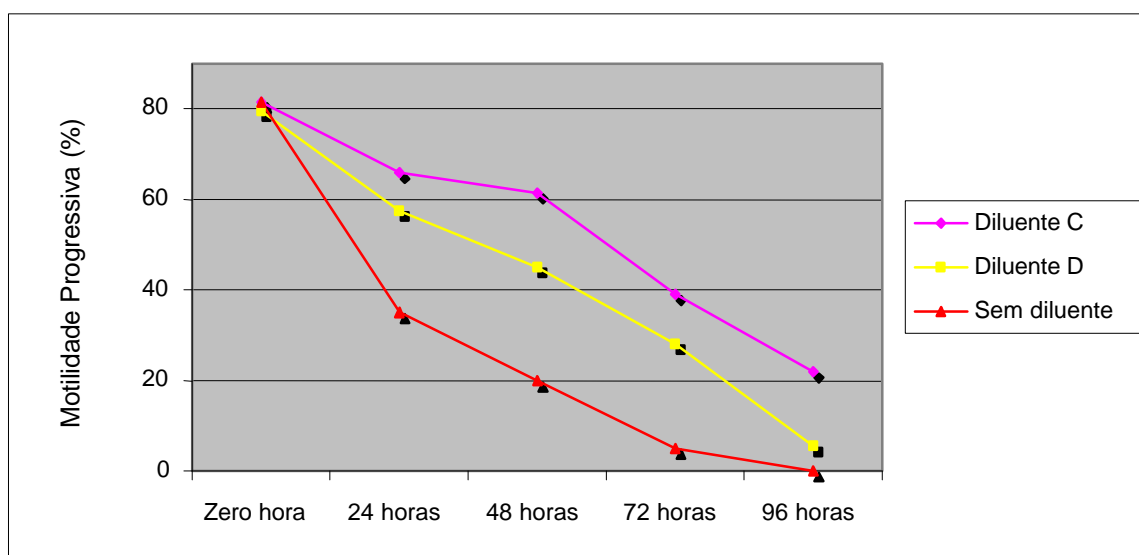
Na comparação da motilidade progressiva entre esses dois diluentes podemos observar, de acordo com a Figura 4 e a Tabela 6, que o diluente C no decorrer das 96 horas de conservação foi sempre superior, entretanto a diferença foi significativa somente em 48 horas ($p \leq 0,05$) e altamente significativa após 96 horas ($p \leq 0,01$).

TABELA 6. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).

Percentual de motilidade média a cada 24 horas					
	Zero hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Diluyente C	81,5 ± 5,3 ^{NS}	66,0±10,8 ^{NS}	61,5± 13,8*	39,0 ± 16,5 ^{NS}	22,0±16,2**
Diluyente D	79,5 ± 3,7 ^{NS}	57,5±16,2 ^{NS}	45,0± 13,1*	28,0 ± 7,5 ^{NS}	5,5± 1,6**
Sem diluyente	81,5 ± 4,1 ^{NS}	35,0 ± 4,7 ^{NS}	20,0 ± 4,1*	5,0 ± 2,4 ^{NS}	0,0 ± 0,0**

*= p ≤ 0,05 (significativo); ^{NS} (não significativo); **= p ≤ 0,01 (altamente significativo)

FIGURA 4. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM MOTILIDADE PROGRESSIVA APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).



4.1.2 Influência dos diluentes e do tempo de armazenamento sobre a integridade do acrossoma dos espermatozóides.

No percentual de espermatozóides com acrossomas intactos houve também uma contínua redução durante as 96 horas de armazenamento, com utilização dos diluentes TRIS-gema (diluyente A) e leite desnatado (diluyente B), sendo que em 96 horas ainda havia 65% células espermáticas com acrossomas intactos.

Entretanto, as alterações acrossomais acentuaram-se quando o sêmen foi diluído em TRIS-gema + secreção prostática (diluyente C) e leite desnatado + secreção prostática (diluyente D).

Comparação 5: Comparação entre os diluentes TRIS-gema (diluyente A) e leite desnatado (diluyente B).

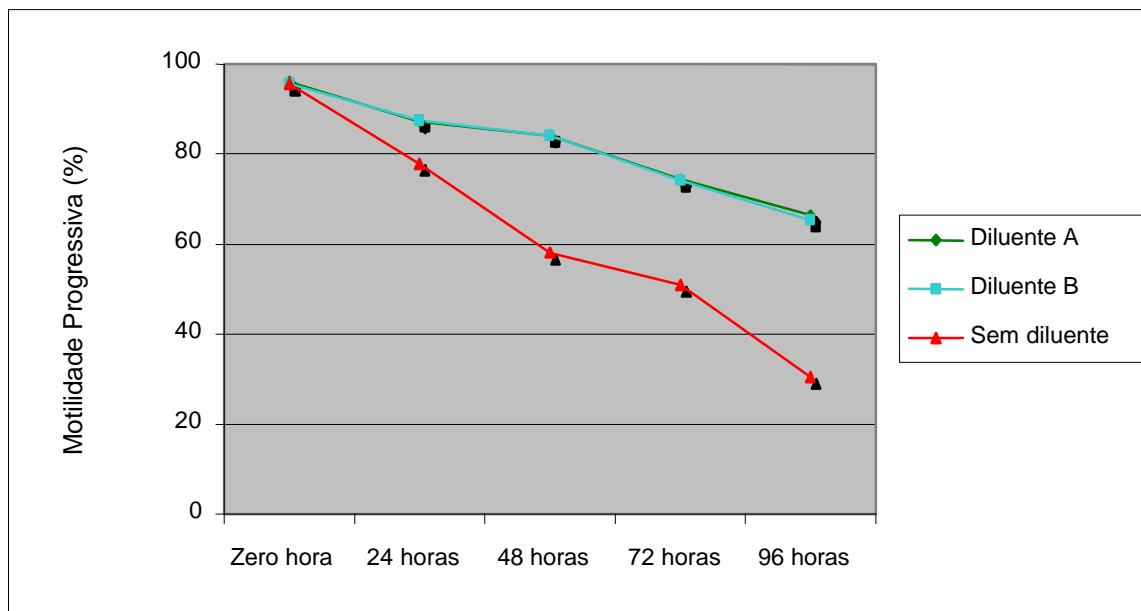
A integridade dos acrossomas das células espermáticas conservadas em ambos os diluentes após 96 horas de armazenamento foi semelhante (65,5 e 65,4 %, respectivamente). Conforme se observa na Figura 5 e Tabela 7, não houve diferença significativa entre os dois diluentes.

TABELA 7. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E LEITE DESNATADO (DILUENTE B).

	Percentual de motilidade média a cada 24 horas				
	Zero hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Diluyente A	96,1± 0,4 ^{NS}	87,2±0,8 ^{NS}	84,2± 0,6 ^{NS}	74,3± 0,4 ^{NS}	66,5±0,7*
Diluyente B	95,6± 0,7 ^{NS}	87,5±0,5 ^{NS}	84,2± 0,8 ^{NS}	74,1± 0,7 ^{NS}	65,4± 0,4*
Sem diluyente	95,5 ± 0,5 ^{NS}	77,8± 0,6 ^{NS}	58,1± 0,7 ^{NS}	50,9 ± 0,7 ^{NS}	30,5 ± 1,1*

*= p ≤ 0,05 (significativo); ^{NS} (não significativo);

FIGURA 5. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E LEITE DESNATADO (DILUENTE B)



Comparação 6: Comparação entre diluentes TRIS-gema (diluyente A) e TRIS-gema+ secreção prostática (diluyente C).

Na Tabela 8 e Figura 6 é possível observar que houve maior redução de alterações acrossomais nos espermatozoides diluídos em TRIS-gema + secreção prostática (diluyente C), sendo essa diferença altamente significativa nas 24, 72 e 96 horas de armazenamento ($p \leq 0,01$).

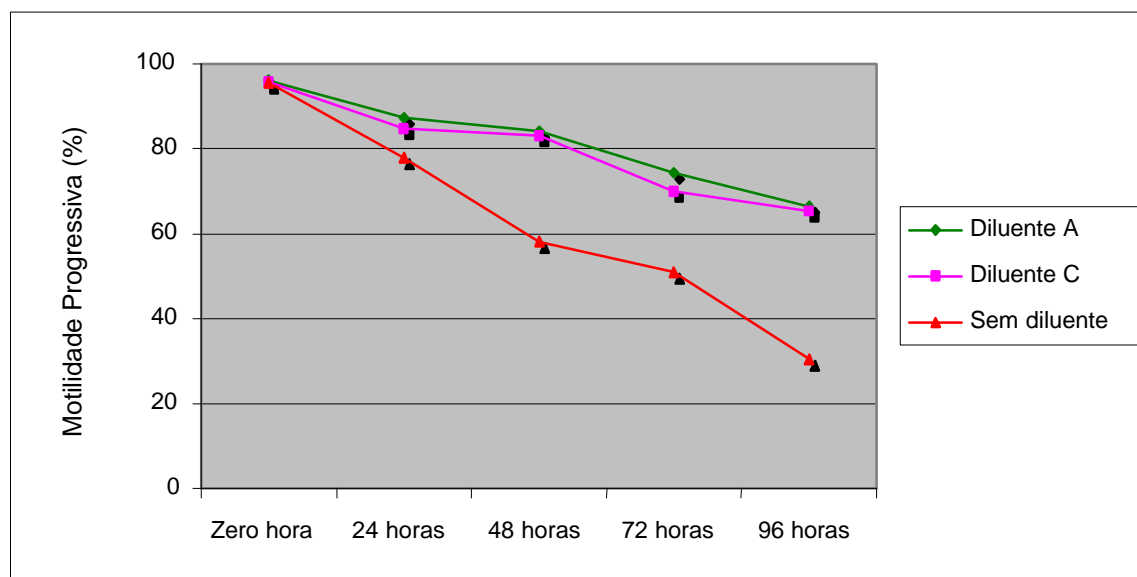
Em 72 horas de armazenamento observou-se menor porcentagem de alterações acrossomais com utilização do diluyente C (leite desnatado + secreção prostática).

TABELA 8. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C)

	Percentual de motilidade média a cada 24 horas				
	Zero hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Diluyente A	96,1± 0,4 ^{NS}	87,2±0,8 ^{**}	84,2± 0,6 ^{**}	74,3± 0,4 ^{**}	66,5±0,7 ^{**}
Diluyente C	95,7± 0,4 ^{NS}	84,6±0,7 ^{**}	83,1± 1,2 ^{**}	70,0± 0,8 ^{**}	65,4± 0,4 ^{**}
Sem diluyente	95,5 ± 0,5 ^{NS}	77,8± 0,6 ^{**}	58,1± 0,7 ^{**}	50,9 ± 0,7 ^{**}	30,5 ± 1,1 ^{**}

^{NS} (não significativo);; ** = p ≤0,01 (altamente significativo)

FIGURA 6. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS (DILUENTE A) E TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C)



Comparação 7: Comparação entre os diluentes leite desnatado (diluyente B) e leite desnatado + secreção prostática (diluyente D).

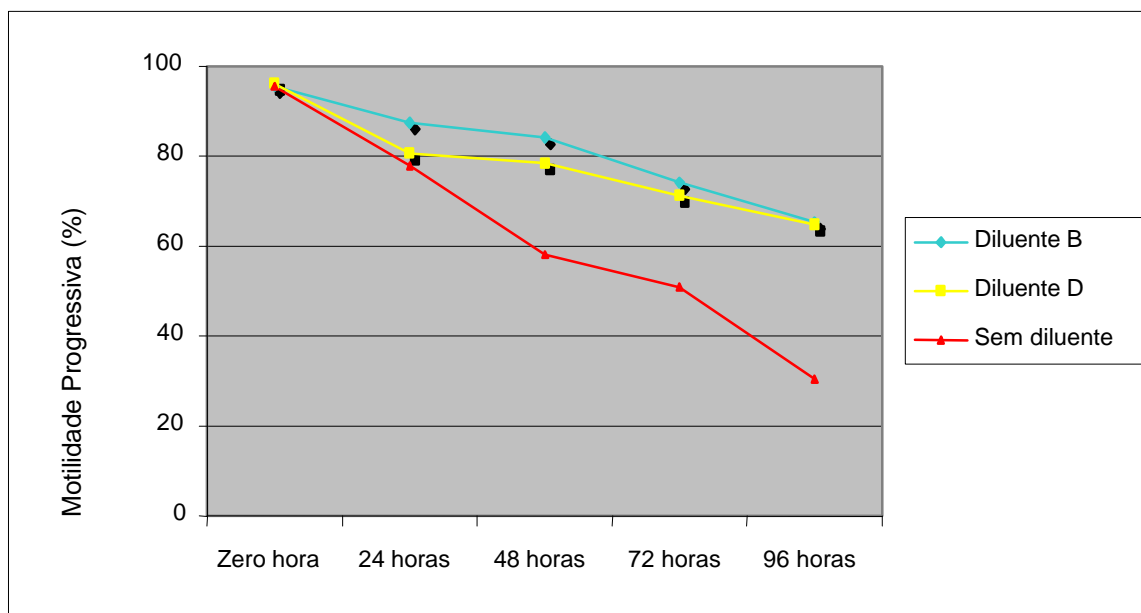
Na Tabela 9 e Figura 7 é possível observar que houve também maior incidência de alterações acrossomais nos espermatozóides das amostras do diluyente D (leite desnatado+ secreção prostática) quando comparadas com amostras do diluyente B (leite desnatado). A diferença foi altamente significativa ($p \leq 0,01$) em 24, 48 e 72 horas sendo, entretanto, significativa em 96 horas ($p \leq 0,05$).

TABELA 9. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM LEITE DESNATADO (DILUENTE B) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D)

	Percentual de motilidade média a cada 24 horas				
	Zero hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Diluyente B	95,6± 0,7*	87,5±0,5*	84,2± 0,8**	74,1± 0,7**	65,4±0,4**
Diluyente D	96,2± 0,3*	80,7±0,8*	78,4± 0,4**	71,3± 1,2**	64,7± 0,7**
Sem diluyente	95,5 ± 0,5*	77,8± 0,6*	58,1± 0,7**	50,9 ± 0,7**	30,5 ± 1,1**

*= $p \leq 0,05$ (significativo); ** = $p \leq 0,01$ (altamente significativo)

FIGURA 7. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM LEITE DESNATADO (DILUENTE B) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).



Comparação 8: Comparação entre os diluentes TRIS-gema + secreção prostática (diluyente C) e leite desnatado + secreção prostática (diluyente D).

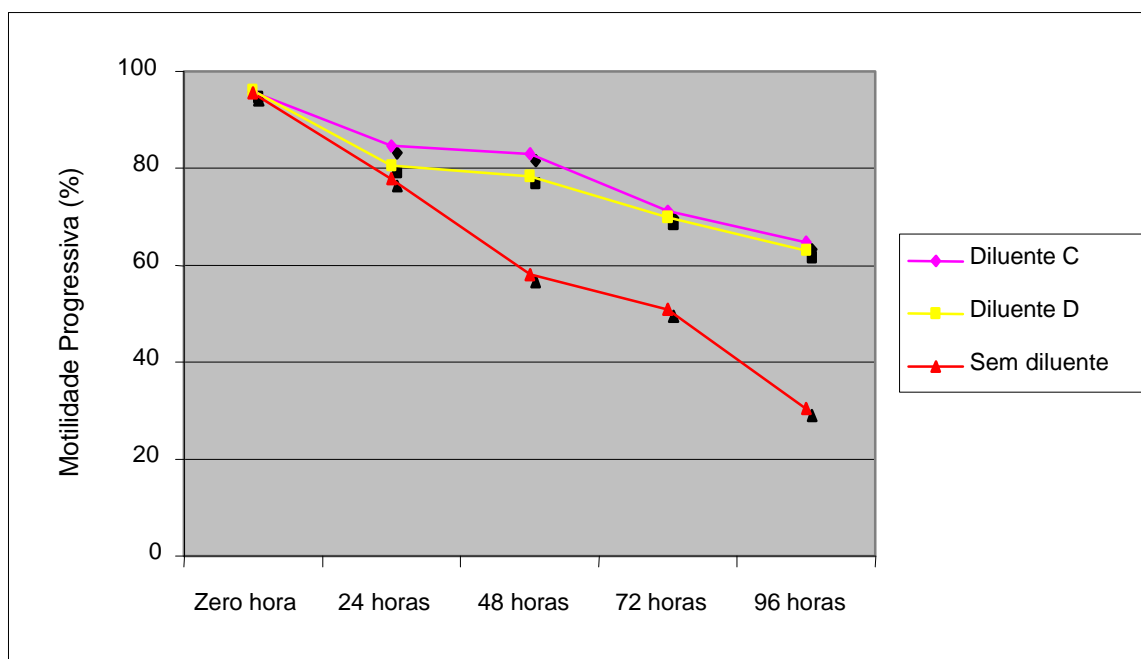
Na avaliação comparativa entre os diluentes C e D pode-se observar, de acordo com a Figura 8 e Tabela 10, que o índice de acrossomas intactos nos espermatozoides diluídos em leite desnatado + secreção prostática (diluyente D) é menor, apresentando alta significância nas 24, 48, 72 e 96 horas de armazenamento ($p \leq 0,01$).

TABELA 10. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).

	Percentual de motilidade média a cada 24 horas				
	Zero hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Diluyente C	95,7± 0,4*	84,6±0,7**	83,1± 1,2**	71,3± 1,2**	64,7±0,7**
Diluyente D	96,2± 0,3*	80,7±0,8**	78,4± 0,4**	70,0± 0,8**	63,1± 0,6**
Sem diluyente	95,5 ± 0,5*	77,8± 0,6**	58,1± 0,7**	50,9 ± 0,7**	30,5 ± 1,1**

*= p ≤ 0,05 (significativo); ** =p ≤ 0,01 (altamente significativo)

FIGURA 8. PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES COM ACROSSOMAS INTACTOS APÓS DILUIÇÃO DO SÊMEN CANINO COM TRIS+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE C) E LEITE DESNATADO+SECREÇÃO PROSTÁTICA (DILUENTE D).



4.1.3 Evolução da motilidade progressiva no tempo.

Na Tabela 11 e Figura 9 constam os resultados de motilidade progressiva no decorrer das 96 horas de conservação do sêmen com os diluentes A, B, C e D, bem como a motilidade progressiva apresentada pelas amostras de sêmen não diluído.

TABELA 11. PERCENTUAL DE MOTILIDADE PROGRESSIVA DE ESPERMATOZÓIDES DE SÊMEN CANINO NÃO DILUÍDO E COM UTILIZAÇÃO DOS DILUENTES A, B, C E D NO TEMPO.

Percentual de motilidade média a cada 24 horas					
	Zero hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Diluyente A	81,0 ± 4,6	74,0 ± 5,7	65,5 ± 7,2	53,5 ± 9,1	45,5 ± 6,4
Diluyente B	80,5 ± 3,7	70,5 ± 5,0	59,5 ± 5,0	41,5 ± 12,0	32,0 ± 3,5
Diluyente C	81,5 ± 5,3	66,0 ± 10,8	61,5 ± 13,8	39,0 ± 16,5	22,0 ± 16,2
Diluyente D	79,5 ± 3,7	57,5 ± 16,2	45,0 ± 13,1	28,0 ± 7,5	5,5 ± 1,6
Sem diluyente	77,5 ± 4,1	42,5 ± 4,7	27,5 ± 4,1	7,5 ± 2,4	3,0 ± 0,0

FIGURA 9. PERCENTUAL DE MOTILIDADE PROGRESSIVA DE ESPERMATOZÓIDES DE SÊMEN CANINO NÃO DILUÍDO E COM UTILIZAÇÃO DOS DILUENTES A, B, C E D NO TEMPO.

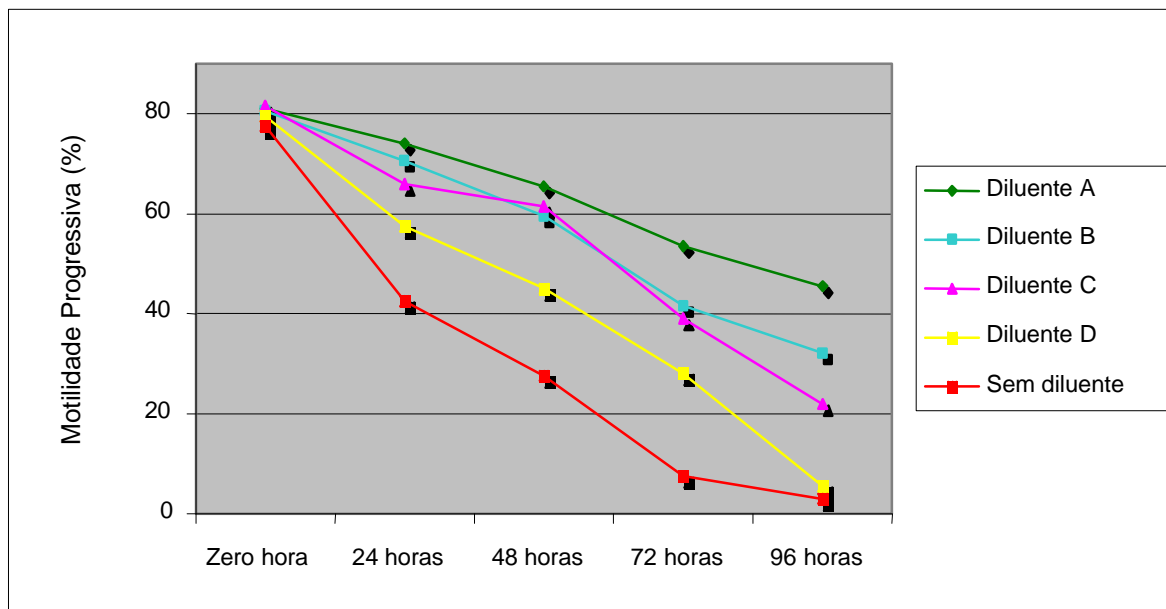
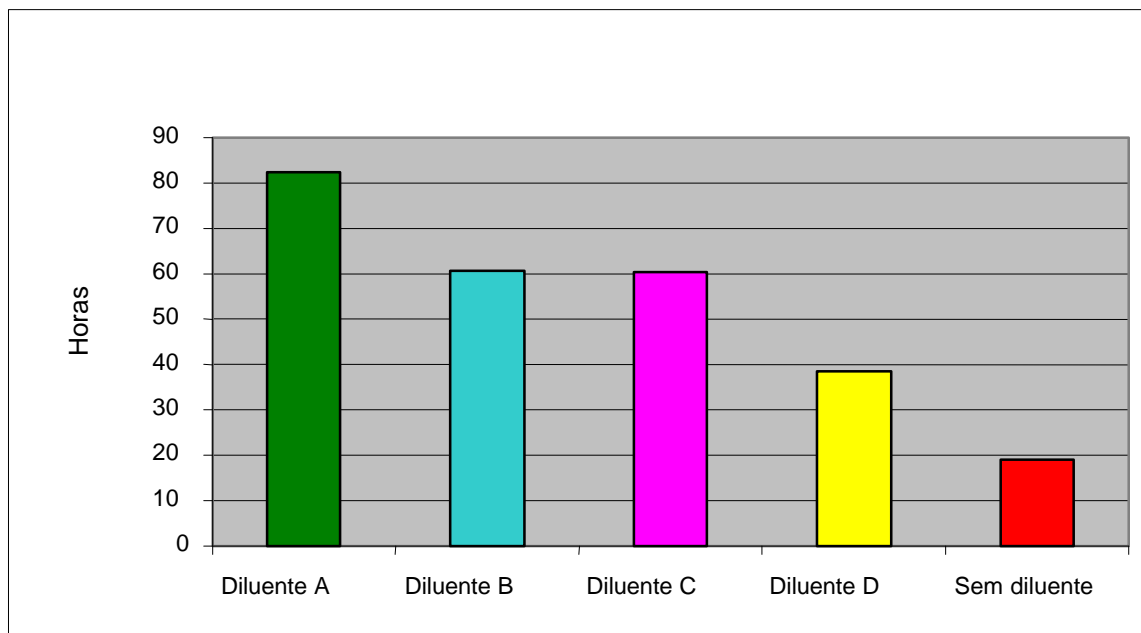


TABELA 12. TEMPO DECORRIDO ATÉ QUE A MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZÓIDES DE SÊMEN CANINO ATINJA 50%.

DILUENTES	A	B	C	D	Sem diluente
HORAS	82,5	60,7	60,3	38,4	18,9

FIGURA 10. TEMPO DECORRIDO ATÉ QUE A MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZÓIDES DE SÊMEN CANINO ATINJA 50%

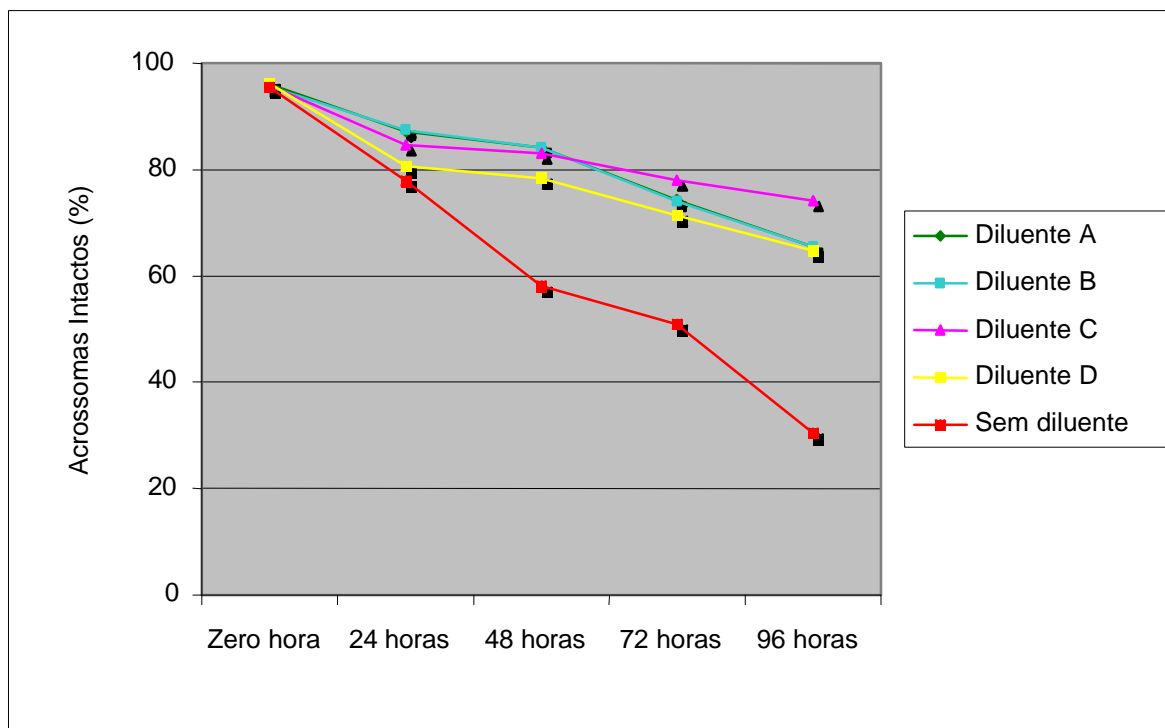


Considerando motilidade progressiva de, no mínimo, 50% para que o sêmen diluído seja considerado viável (fecundante) para utilização na inseminação artificial (GÜNZEL, 1984), a Tabela e Figura 12 mostram os períodos de tempo (em horas) em que as amostras de sêmen dos diferentes diluentes atingem, gradativamente, essa motilidade.

TABELA 13. PERCENTUAL MÉDIO DE ACROSSOMAS INTACTOS NO SÊMEN CANINO DILUÍDO COM DIFERENTES DILUENTES NO PERÍODO DE 96 HORAS DE ARMAZENAMENTO A 5° C.

	Horas				
	Zero hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Diluyente A	96,1± 0,4	87,2 ±0,8	84,2± 0,6	74,3± 0,4	65,5±0,7
Diluyente B	95,6± 0,7	87,5±0,5	84,2± 0,8	74,1± 0,7	65,4± 0,4
Diluyente C	95,7 ±0,4	84,6± 0,7	83,1±1,2	78,0 ±0,8	74,2± 0,6
Diluyente D	96,2± 0,3	80,7± 0,8	78,4 ±0,4	71,3± 1,2	64,7±0,7
Sem diluyente	95,5 ± 0,5	77,8± 0,6	58,1± 0,7	50,9± 0,7	30,5 ± 1,1

FIGURA 11. PERCENTUAL MÉDIO DE ACROSSOMAS INTACTOS NO SÊMEN CANINO DILUÍDO COM DIFERENTES DILUENTES NO PERÍODO DE 96 HORAS DE ARMAZENAMENTO A 5° C.



5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, no decorrer de 96 horas foi avaliada a conservação do sêmen de dois cães, utilizando-se quatro diluentes. Como critérios de avaliação foram considerados a motilidade progressiva e a integridade dos acrossomas.

O objetivo do experimento foi verificar o comportamento do sêmen canino diluído e conservado a 5°C no transcorrer de quatro dias e, com isso, servir de referência para assegurar a fertilidade por um período desejável de conservação de 72 horas (3 dias).

Sendo a motilidade das células espermáticas considerada parâmetro insuficiente para assegurar a fertilidade, o exame da morfologia do acrossoma foi considerado fundamental na avaliação qualitativa do sêmen diluído (GILL *et ali.*, 1970; SAACKE e WHITE, 1972; HELLEMANN, 1976; WEITZE, 1977; BAUMGARTL, 1980; OETTLE, 1986; SCHAAP, 1987; OTJEN, 1988; WABERSKI, 1988; BOUCHARD *et ali.*, 1990).

5.1 Influência dos diluentes e do tempo de conservação sobre a motilidade progressiva dos espermatozóides.

Os resultados desse trabalho ratificam a importância da diluição e conservação do sêmen a 5°C por período prolongado, já que o sêmen não diluído reduz significativamente sua capacidade fecundante em 24 horas (Figuras e Tabelas 3 a 11). Esses dados corroboram os resultados encontrados por GÜNZEL-APEL e EKROD (1991) e MÜLLER (1992).

Na conservação do sêmen diluído com TRIS-gema e leite desnatado após 96 horas de armazenamento e resfriamento a 5° C, a motilidade progressiva foi de 66,5% e 65,4% respectivamente, o que corresponde a uma diferença com a motilidade inicial.

BOUCHARD *et al.* (1990) em pesquisa semelhante com sêmen diluído em TRIS comercial, obtiveram motilidade inicial após período de conservação de 96 horas reduzida para 5%. Entretanto, essa variação significativa é atribuída à concentração de apenas 3,5% de gema de ovo. Na avaliação comparativa entre o diluente TRIS-gema e o leite desnatado, este apresentou motilidade progressiva inferior e altamente significativa após 96 horas de conservação, o que não foi observado por MÜLLER (1992).

Na diluição do sêmen com TRIS-gema e leite desnatado com secreção de próstata (gráfico e tabela 1), após 24 horas de conservação houve redução significativa na motilidade progressiva que, segundo GÜNZEL-APEL e EKROD

(1991) é atribuída à maior liberação de energia obtida pela desfosforilação do ATP.

Com a adição de secreção de próstata aos meios diluidores TRIS-gema e leite desnatado após 72 horas de conservação a 5°C (Tabela 6 e Figura 4) chegou-se a valores inferiores aos 50% de motilidade progressiva, considerados necessários para assegurar a fertilidade do sêmen do cão para inseminação artificial (GÜNZEL-APEL,1994).

5.2 Influência dos diluentes e do tempo de conservação sobre a integridade do acrossoma.

Após as 96 horas de conservação do sêmen a 5°C, independentemente do diluente utilizado, podemos observar nas Tabelas 7, 8, 9, 10 e Figuras 5, 6, 7 e 8 uma média de 62% dos espermatozoides com os acrossomas intactos. Estes resultados corroboram com trabalhos de SAACKE e WHITE (1970), que demonstraram não existir correlação direta entre motilidade progressiva e alterações acrossomais.

Isso acentua a necessidade da apreciação dos dois parâmetros na avaliação do sêmen para uso na inseminação artificial. Assim sendo, após 72 horas de conservação do sêmen, todos os diluentes apresentaram células espermáticas com mais de 70% de acrossomas intactos.

Em relação aos requisitos de qualidade desejados para conservação do sêmen a 5°C, os resultados dos diluentes TRIS-gema e leite desnatado são considerados suficientes no transcorrer de 72 horas. Entretanto, estes dois diluentes adicionados de secreção prostática não conservaram de forma desejável a motilidade progressiva e a integridade dos acrossomas na conservação do sêmen canino a 5°C no decorrer deste experimento.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

Após as várias diluições e conservação a 5°C obteve-se sêmen canino com características consideradas adequadas, ou seja, motilidade progressiva e integridade de acrossomas, após os seguintes tratamentos:

1. Diluição com TRIS-gema até 82,5 horas de conservação.
2. Diluição com leite desnatado até 60,7 horas.
3. Diluição com TRIS-gema + secreção prostática até 48 horas de conservação.
4. Diluição com leite desnatado + secreção prostática até 24 horas de conservação.
5. A adição de secreção prostática aos meios diluidores não proporcionou resultados satisfatórios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AK, K.; ILERI, I.K. a Studies on the use of milk powder as na extender for bull semen in Turkey. 2. The effect of different levels of egg yolk in milk powder extender on spermatozoa. **An. Repr. and Devel.**, v. 17, n. 1, p. 31-37, Istanbul, 1991.
2. AK, K.; ILERI, I.K. b Studies on the use of milk powder as na extender for bull semen in Turkey. 1. Effect of different levels of egg yolk in milk powder extender on spermatozoa. **An. Repr. and Devel.**, v. 17, n. 1, p. 21-29, Istanbul, 1991.
3. AMMAN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoa function (1992). In: McKinnon, A .U.; VOSS, J.L. (Ed.). **Eq. Reprod.**, Philadelphia: Lea and Febiger, p. 715, 1993.
4. ANDRADE, J.S.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; LEITE, R.C.; NEVES, M.M.; PINHO, J.F.; SARDINHA, L. Sêmen caprino congelado: efeito de dois diluentes sobre taxa de fertilidade. **Rev. Bras. de Reprod. An.**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 363-365, 1999.
5. BAUMGARTL, C. Licht - und elektronenmikroskopischen Untersuchung über Veränderungen der Plasmamembran und Akrosomstruktur von Pferdespermien. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemanha, 1980.
6. BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D. Effect of storage temperatures, cooling rates and two differents semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriog.**, v. 34, n.1, p.147-157, Missouri, 1990.
7. BRACKETT, B.G.; WILLIAMS, W.L. ATP content of spermatozoa, semen and seminal plasma. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, (s.l.), v. 125, p.1135-1136, 1967.

8. CALAMERA , J.C.; S. BURGO; O.VILAR. Relation between motility and adenosintriphosphatase (ATP) in human spermatozoa. **Androl.**, (s.l.) v. 14, p. 239-241,1982.
9. COMHAIRE. F.; VERMEULEN, L.; GHEDIRA, K.; MAS, J.; IRVINE, S.; CALLIPOLITIS, G. Adenosine triphosphate in human semen: a quantitative estimate of fertilizing potential. **Fertil. and Steril.**, (s.l.), v. 40, p. 500-504,1983.
10. DEKA, B.C.; RAO, A.R. Effect of extenders on the biometrics of ram sperm head. **Ind. Vet. J.**, (s.l.), v. 57, p. 905-908, (s.l.), 1980.
11. EKROD, B. Untersuchungen der Spermienmotilität und der Adenosin-5-Triphosphat Konzentration sowie der Aktivität seminaler Phosphatasen in Hundesperma. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemanha, 1989.
12. ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. An investigation into the origin of the first fraction of canine ejaculate. **Rev. Vet. Sci.**, v. 49, p. 66-70, (s.l.), 1990.
13. ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. Comparision of the quality of frozen and cooled-rewarmed dog semen. **Theriog.**, v. 46, n. 1, p.165-171, London, 1996.
14. FRENETTE, G., DUBE, J.Y.; TREMBLAY, R.R. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. **Arch. of Androl.**, v. 16, n. 3, p. 235-241, Quebec, 1986.
15. FROMAN, D.P.; ARMANN, R.P.; RIEK, P.M.; OLAR, T.T. Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage. **J. of Reprod. and Fertil.**, v. 70, p. 301-308, Fort Collins,1984.
16. GILL, H.P.; KAUFMANN, C.F.; FOOTE, R.H.; KIRK, R.W. Artificial insemination of Beagle bitches with freshly collected, liquid stored, and frozen-stored semen. **Am. J. of Vet. Res.**,(s.l.), v. 31, p.1807-1813, 1970.

17. GUERRA, F.F.; NUNES, J.F. Fertilidade e avaliação *in vitro* do sêmen oivno resfriado e conservado em água de côco por 72 horas. **Rev. Bras. Reprod. An.**, v. 23, n. 3, p. 287-289, Belo Horizonte, 1999.
18. GÜNZEL, A.R. Zur Spermagewinung, -beurteilung und -konservierung sowie Samenübertragung beim Hund. **Tierärztl. Prax.**, Hannover, v. 14, n. 2, p. 272-288, 1986.
19. GÜNZEL, A.R.; KRAUSE, D. Läufigkeitsüberwachung und Samenübertragung beim Hund. **Tierärt. Umsch.** 8, p. 566-570, Hannover, Alemanha, 1986.
20. GÜNZEL-APEL, A.R.; EKROD, B. Einflüsse von Prostatasekret und Verdünner auf die Spermienmotilität und ATP- Konzentration sowie die Aktivität der sauren und alkalischen Phosphatase von Beagle-Samen., **Reprod. in Dom. An.**, v. 26, n.1, p.31-41, Hannover, Alemanha, 1991.
21. HARRIS, G.C.; THURSTON, R.J.; CUNDALL, J. Changes in the ultrastructure of the fowl spermatozoon due to rapid freeze-thaw. **J. of Reprod. and Fertil.**, (s.l.), v.34, n.3, p. 389-394, 1973.
22. HARRISON, R.A.P.; DOTT, H. M.; FOSTER, G.C. Effect of ionic strenght, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa. **J. of Reprod. and Fertil.**, (s.l.), v. 52, n.1, p. 65-73, 1978.
23. HARROP, A .E. Semen preservation and artificial insemination. Proc. 4 ° Int. Congr. Anim. Reprod., **The Hauge** 4, p. 898-901, 1961.
24. HEITE, H.J.; WETTAUER, W. Zur Kenntnis der sauren Phosphatase im Seminalplasma - Bestimmungsmethode und diagnostische Bedeutung. **Androl.**, (s.l.), v. 11, p. 480-482, 1979.
25. hellemann,C. Motilität und Akrosomintegrität als Fruchtbarkeitsparameter von tiefgefrorenen Kanichensperma. Dissertassion, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemanha, 1976.
26. HUWER, M. Untersuchung zur Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma unter besonderer Berücksichtigung der Samenzentrifugation.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemanha, 1984.

27. INAMASSU, A .; UECHI, E.; LOPES, M.D. Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Rev. Bras. de Reprod. An.**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p.151-478, 1999.
28. JONES, R.C. Collection, motility and storage of spermatozoa from the African elephant *Loxodonta africana*. **Nat.** (U.K.), v. 243, n. 5401, p. 39-39, London, 1973.
29. JONES, R.C.; MARTIN, I.C.A .The effects of dilution, egg-yolk and cooling to 5 deg C on the ultrastructure of ram spermatozoa. **J. of Reprod. and Fertil.**, (s.l.), v. 35, n. 2, p.311-320, 1973.
30. KÄHN, W. Zur ATP-, ADP- und AMP-Bestimmung mit dem Biolumineszenzverfahren im Sperma einiger Haustiere. Dissertation, Ludwig- Maximilian Universität München, München, Alemanha,1981.
31. KOBER, C. Vergleichende Untersuchungen von Verdünnern zur Spermakonservierung bei Schwein, Pferd und Hund unter besonderer Berücksichtigung physikalischer Eigenschaften. Dissertation, p. 151-152, Ludwig- Maximilians Universität München, München, Alemanha, 1985.
32. KRAUSE, B. Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde. Tese de Livre Docência, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemanha, 1966.
33. KRAUSE, D. Zur Fertilitätsuntersuchung beim Hund. **Deuts.Tier. Wochensch.**, (s.l.), v. 72, p. 3-10, 1965.
34. KUMI,-DIAKA.J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriog.**, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.

35. LINDE-FORSBERG, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. **Semin. in Vet. Med. and Surg. (Small An.)**, v. 10, n.1, p. 48-58, Uppsala,1995.
36. MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. Capacitation, acrossome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple define medium. **Gam. Res.**, (s.l.), v .1, p. 101-109, 1978.
37. MCCONELL, J.D; STONE, D.K.; JOHNSON, L; WILSON, M. Partial purification and characterization of dynein adenosine triphosphatase from bovine sperm. **Biol. of Reprod.**, (s.l.), v. 37, p. 385-393, 1987.
38. MERKT, H.; SIEME, H.; MUSA, B.; HAGO, B.E.D.;WILLEM, T. Etudes et synthèses de ITEMVT; **Actes de l'Atelier "Peut on ameliorer les performances de reproduction des camelins"**, n. 41, p. 273-284, Paris, 1990.
39. MIES FILHO, A . ; SOUZA, I.M. Congelação do sêmen de bode. Efeito de duas soluções de lavagem. **A Hora Vet.**, (s.l.), n. 29, p. 53-58, 1986.
40. MIES FILHO, ANTÔNIO. **Reprod. dos An. e Insem. artif.**, v. 2, 4 ed.: Sulina, Porto Alegre, 1978.
41. MILLER, M.E., CHRISTENSEN, G.C. **Anatomy of the dog**. Ed. Saunders, London, 1979.
42. MORTON, D.B.; BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **J. of Reprod. and Fertil.**, v. 39, p. 311-316, 1989.
43. MÜLLER, A. Einflüsse verschiedener Verdünnermedien auf Motilität und Kopfkappenintegrität von flüssigkonservierten Hundesperma. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemanha,1992.
44. MULTAMÄKI , S.J.; SUOMINEN, J.J.O.; DJUPSUND, B.M. Improvement of spermatozoal motility characteristics. **Arch. of Andr.**, (s.l.),v. 4, p.125-132, 1980.

45. NASCIMENTO, E.F.; NASCIMENTO, J.K.; SILVA FILHO, J.M. Efeito do diluente mínima contaminação sobre a fertilidade do sêmen suíno resfriado a 16 e 5° C e armazenado por 24 horas. **Rev. Bras. de Reprod. An.**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 285, 1999.
46. NOTHLING, J.O; GERSTENBERG, C.; VOLKMANN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – A retrospective study. **J. of South Afr. Vet. Assoc.**, v. 66, n. 2, p. 49-55, Pretoria, 1995.
47. NUNES, J.F. El agua de coco (*Coccus nucifera*) in natura integral y adicionada de concitoquininas como diluidor del semen caprino. **Rev. Cient.**, FVC, (s.l.), v. 3, n. 3, p. 273,1993.
48. OETJEN, M. Überprüfung verschiedener Akrosomfärbungen zur Qualitätsbeurteilung von Nativ- und Tiefgefriersperma des Pferdes. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemanha, 1988.
49. OETTLE , E.E. Changes in acrosome morfology during cooling and freezing of dog semen. **An. Reprod. Sci.**, (s.l.), v.12, p. 145-150, 1986.
50. PACE , M.M.; Sullivan, J.J.; Elliot, F.G.; Graham, E.F.; Coulter, G.M. Effects of thawing temperatures, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa frozen in 5-ml french straws. **J. of An. Sci.**, (s.l.), v. 53, p. 693-70,1981.
51. PROVINCE, C. a.; AMMAN, R.P.; PICKETT, B.W. extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5° C. **Theriog.**, (s.l.), v. 22, p. 409-415, 1984.
52. RAMADAS, K; IYER, C.P.N; RAJA, C.K.S.V. A preliminary report on the effect of honey as a constituent in extenders. **Ker. J. of Vet. Sci.**, (s.l.), v. 10, n.1, p. 85-88,1979.
53. RODRIGUEZ, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriog.**, v. 42, n. 5, p. 815-829, Bellaterra, 1994.

54. ROTA, A.; STROM, B; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4° C. **Theriog.**, v. 44, n. 6, p. 885-900, Uppsala, 1995.
55. ROYCHOUDHURY, P.N.; DUBAY., M.L. Observation on dog semen. I. Dilution and conservation in three extenders. **Zootec. Vet.**, v. 29, p. 117-121, 1974.
56. SAACKE , R.G.; WHITE, J.M. Morfology of the sperm and its relationship to fertility. **Proc. 3 ° Techn. Conf. Anim. Reprod. Artif. Insem. Nat. Assoc. Anim. Breed.**, p. 17-30, Chicago, 1970.
57. SAACKE , R.G.; WHITE, J.M. Semen quality tests and their relationship to fertility. **Proc. 4 ° Techn. Conf. Anim. Reprod. Artif. Insem. Nat. Assoc. Anim. Breed.**, p. 22-27. Chicago, 1972.
58. SAINZ, J.J.; Josa, A ; ESPINOSA, E.; NINO-JESUS, A. Refrigeración del semen de perro: temperatura y tiempos de supervivencia y activación. In: **Quinto Simp. Int. de Reprod. An.**, p. 481-487, Zaragoza, 1993.
59. SCHAAP, P. Über die Verlängerung der Haltbarkeit frischverdünnten Eberspermas unter besonderer Berücksichtigung des Bovinen Serumalbumins. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemania, 1987.
60. SCHEID, I.R. Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma in Kunststoffrohren-Erprobung der Gefrierschutzsubstanzen Glycerin, Dimethylsulfoxid und Acetamid. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemania, 1980.
61. SEAGER, S.W.I. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. **AI. Dig.**, (s.l.), v. 17, p. 6-7, 1969.
62. SMITH, E.R. The canine prostate and its secretion. **Adv. Sex. Horm. Res.**, (s.l.), v. 1, p. 167-204, 1975.
63. SÖDERQUIST, L.; LARSSON, I. Relationship between ATP content and post thaw motility in bull semen. **Acta Vet. Scand.**, (s.l.), v. 26, p.308-312, 1985.

64. SOYLU, M.K; GOKCEN, H; TUMEN,H; DOGAN,I. Sperm characters and fertility of ram diluted with different amounts of alpha-chymotripsin. **Veteriner-Fakultesi-Dergisi**, Uludag Universitesi, Uludag, v. 11, n.1-3, p.83-90, 1991.
65. Syväri, K. **Morphologische und funktionelle Untersuchungen am Akrosom der Hundesamenzelle.** Tese de Livre Docência, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemanha, 1984.
66. TIWARI, S.B.; SRIVASTA, A.K.; SAHNI, K.L. Some metabolic changes in ram semen stored in the milk diluent. **Indian Vet. J.**, (s.l.), p. 111-115, 1977.
67. TULI, R.K., HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. **Theriog.**, (s.l.), v. 42, n. 3, p. 547-555, 1994.
68. WABERSKI, D. In vitro- Besamungsversuche unter Praxisbedingungen mit langzeitkonserviertem Eberflüssigsperma unter besonderer Berücksichtigung von BSA und Puffer im Verdünnermedium. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Alemanha, 1988.
69. WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. Artificial insemination of sheep: the fertility of semen extended in diluents containing egg yolk and inseminated soon after dilution or stored at 5° C for 24 or 48 hours. **Theriog.**, (s.l.), v. 6, n. 5, p. 553-558, 1975.
70. WEITZE, K.F. **Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Kanichensperma.** Tierärztliche Hochschule Hannover, Tese de Livre Docência, Hannover, Alemanha, 1977.
71. YOUNG, L.G ; SMITHWICK, E.B. Studies on the flagellar ATPase of bull spermatozoa: extraction and characterization. **J. Exp. Zool.**,(s.l.), v. 226, p. 459-465, 1983.
72. YUBI,C.A.; Ferguson, J.M.; Renton, J.P.; Harker, S.; Harvey, M. J. A.; Bajyenji, B.; Douglas, T.A. Some observations on the dilution, cooling

and freezing of canine semen. J. of Sm. An. Prac., (s.l.), v. 28, p. 753-761, 1987.

8. ANEXOS

A. Composição básica da ração para cães:

Farinha de carne, hidrolizado de carne de aves, cereais, gordura animal estabilizada, premix vitamínico-mineral.

Níveis de garantia: umidade máxima 10%; proteína bruta mínima 22%; extrato etéreo mínimo 8%; matéria fibrosa máxima 4%; cálcio máximo 1,8%.

Enriquecimento por kg do produto: vitaminas A 10.000 U.I.; D³ 1.000 U.I.; E 65 mg; B¹ 3,9 mg; K3 0,17 mg; B¹² 40 mcg; proteína digerível 8 mg; ácido fólico 0,46 mg; ácido pantotênico 13 mg; colina 483 mg.

B. Composição dos diluentes A e B

Diluyente A (solução TRIS)

Trishidroximetil-aminometano	3,02 g
Frutose	1,25 g
Ácido cítrico	1,78 g
Água bidestilada (q.s.p)	100 ml

Diluyente B (solução leite desnatado)

Leite desnatado em pó	2,4 g
Glicose	4,9 g
Água bidestilada (q.s.p)	100 ml

Leite desnatado em pó: Composição em 100 g de pó: Gordura máxima 1,0 gr; proteínas 35,3g, lactose 51,9 g; sais minerais 7,8 g; vitamina A 3091 U.I.; vitamina D³ 231 U.I.

C. Composição da Solução de formol-salina

Citrato de sódio	2,9 g
Solução de formol 35%	4 ml.
Água bidestilada (q.s.p)	100 ml
