

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

ANNA LAURA NUNES MOURA

CONGELAMENTO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS EM CÃES

**UBERLÂNDIA
NOVEMBRO DE 2017**

ANNA LAURA NUNES MOURA

CONGELAMENTO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS EM CÃES

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de Médico Veterinário, no curso de Medicina Veterinária, no curso de Medicina Veterinária da Universidade de Federal de Uberlândia.

Orientadora: Prof. Dra. Teresinha Inês Assumpção

UBERLÂNDIA

NOVEMBRO 2017

ANNA LAURA NUNES MOURA

CONGELAMENTO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS EM CÃES

Trabalho de conclusão de curso
aprovado como requisito parcial à
obtenção do grau de Médico
Veterinário, no curso de Medicina
Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia.

Uberlândia, 06 de dezembro de 2017 às 09h00min

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Teresinha Inês de Assumpção
Orientadora (FAMEV – UFU)

Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo
Membro (FAMEV – UFU)

Mayara Mafra Soares
Membro (Mestranda FAMEV – UFU)

RESUMO

A criopreservação das células espermáticas recuperadas do epidídimo é uma técnica que possibilita a preservação do material genético de animais post-mortem. O objetivo deste estudo foi testar o congelamento de espermatozoides epididimários em cães utilizando os crioprotetores glicerol e etileno glicol e analisar sua qualidade pós-descongelamento. Foram coletados epidídimos de 10 animais pós-orquiectomia, sendo animais sem seleção, idades variadas e sem raça definida. O sêmen foi recuperado da cauda do epidídimo pela técnica de fatiamento e lavado com 2 ml de solução de PBS (Tampão fosfato-salino). Em seguida foi diluído no meio TRIS-glicose-gema de ovo e os crioprotetores glicerol e etileno glicol a 5%. As amostras de sêmen foram congeladas com 50×10^6 espermatozoides/palheta em processo de congelamento lento. O descongelamento foi feito a 37°C por 30 segundos sendo analisada a motilidade e vigor dos espermatozoides e realizados os testes supravital e hiposmótico. Na análise do sêmen descongelado observamos uma queda drástica de motilidade e vigor com ambos os crioprotetores, sendo 10% e 2 para o glicerol e 5 % e 1 para o etileno glicol, respectivamente. O processo também causou fortes lesões às membranas dos espermatozoides, comprovadas pelos testes hiposmótico e supra-vital, com um total de 64% de células não reativas ao teste hiposmótico e em torno de 55% de células mortas (teste supravital). Podemos concluir que a técnica de fatiamento do epidídimo fornece células espermáticas em boa quantidade e qualidade para análise e que ao congelá-las o crioprotetor glicerol é capaz de dar mais proteção aos espermatozoides em comparação ao etileno glicol na mesma concentração.

Palavras-chave: reprodução, sêmen, epidídimo, crioprotetor, canídeos.

ABSTRACT

The cryopreservation of sperm cells recovered from the epididymis is a technique that allows the preservation of the genetic material of postmortem animals. The objective of this study was to test the freezing of epididymal spermatozoa in dogs, the protective effect of the cryoprotectants glycerol and ethylene glycol and to analyze the motility and spermatogenic vigor after freezing. Epididymides were collected from 10 post-orchietomy animals, being non-selected animals, with undefined ages and no specific breed. The semen was recovered from the epididymis tail by the slicing technique and washed with 2 ml of PBS solution (Phosphate-Buffered Saline). Then, it was diluted in TRIS-glucose-egg yolk diluent and cryoprotectants glycerol and ethylene glycol 5%. Semen samples were frozen in 50x10⁶ sperm/straw in a slow freezing process. Thawing was done at 37°C for 30 seconds, the sperm motility and vigor were analyzed and then the supravital and hyposmotic tests were performed. In the analysis of thawed semen we observed a drastic drop in motility and vigor with both cryoprotectants, being 10% and 2 for glycerol and 5% and 1 for ethylene glycol, respectively. The process also caused severe damage to sperm membranes, confirmed by hyposmotic and supravital tests, with a total of 64% non-reactive cells in the hyposmotic test and around of 55% dead cells (supravital test). We can conclude that the epididymal slice technique provides sperm cells in good quantity and quality for analysis and that, when frozen, the cryoprotectant glycerol is able to give a more protection to the spermatozoas compared to the ethylene glycol in the same concentration.

Key words: reproduction, semen, epididymis, cryoprotectant, canids.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físicas e morfológicas de espermatozoides recém-coletados do epidídimo de cães.....	15
Tabela 2 – Análises de motilidade e vigor pós-descongelamento para os crioprotetores glicerol e etileno glicol em espermatozoides epididimários de cães.....	16
Tabela 3 – Análises comparativas dos testes supravital e hiposmótico para os crioprotetores glicerol e etileno glicol em espermatozoides epididimários de cães.....	17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. Espermatozoides epididimários	8
3.2. Coleta de espermatozoides epididimários	8
3.3. Análises física e morfológica do sêmen.....	9
3.4. Congelamento do sêmen	9
3.5. Meio Diluente	10
3.6. Curva de congelação/descongelação	11
3.7. Análises de sêmen pós-descongelação	11
3.7.1. Motilidade	11
3.7.2. Teste Hiposmótico	12
3.7.3. Teste Supravital	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1. Animais	12
4.2. Coleta do sêmen	13
4.3. Análises física e morfológica do sêmen	13
4.4. Congelamento e descongelamento do sêmen	13
4.5. Análises pós-descongelamento	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
6. CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS	18

1 INTRODUÇÃO

A coleta e a preservação de sêmen em animais domésticos é uma área de estudos que vem sofrendo consideráveis avanços desde a década de 1930, principalmente em animais de alto valor zootécnico. Entretanto, em animais de estimação como os cães, como não foram criados originalmente para serem procriados em grande escala, e sim apenas como animais de companhia tiveram um atraso nas pesquisas sobre técnicas reprodutivas, existindo ainda diversas questões a serem respondidas (SEVERO, 2015).

A extração de espermatozoides a partir do epidídimo é um procedimento alternativo que proporciona as mesmas vantagens que outras formas de recolhimento, oferecendo um material viável e com capacidade fecundante. No entanto, as células obtidas por esta técnica possuem diferenças morfológicas e fisiológicas comparadas com o sêmen ejaculado, sendo assim, vão possuir características específicas quando submetidas ao estresse osmótico causado pela criopreservação, ou seja, o melhor protocolo de congelamento para o sêmen coletado do epidídimo pode não ser o mesmo que para o sêmen fresco (HEWITT et al., 2001). Ainda assim, é um método que oferece vantagens, sendo bastante utilizado em animais de difícil manejo, onde não é possível obter o sêmen ejaculado, e sua maior vantagem é que mesmo após a morte do doador, ainda há possibilidade de garantir células espermáticas viáveis a partir da cauda do epidídimo (HORI et al., 2015).

A criopreservação de espermatozoides adquiridos por meio do epidídimo permite que esse material genético possa ser utilizado a qualquer momento e não apenas após sua coleta. Portanto, o armazenamento do sêmen após a morte ou lesão física do indivíduo é uma ferramenta importante que abre vários leques de opções, tanto para a utilização em inseminações quanto para objeto de estudo (COCCHIA et al., 2009).

Assim, o aprimoramento de um procedimento adequado, desde a coleta até o congelamento do sêmen, possibilitará a preservação de gametas de indivíduos que podem morrer inesperadamente. Consequentemente, como a semelhança reprodutiva de espécies silvestres com os caninos é bastante evidente, o avanço no método de conservação do material genético de cães pode ser a base de estudos para preservação de espécies selvagens em risco de extinção.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi testar o congelamento de sêmen da cauda do epidídimo em cães utilizando os crioprotetores glicerol e etileno glicol e testar a viabilidade das células pós-descongelamento.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Espermatozoides epididimários

O epidídimo é dividido em cabeça, corpo e cauda, que conecta o ducto eferente ao ducto deferente e é responsável pela maturação espermática. É essencial que a célula espermática passe por esse órgão para adquirirem motilidade e capacidade fecundante pois são imaturos e não possuem de motilidade própria quando deixam os testículos (ARROTÉIA et al., 2012).

O epitélio do epidídimo secreta proteínas as quais são responsáveis por promoverem um ambiente ideal para as células, fornecendo temperatura, pH, substrato energético e tensão de oxigênio compatível com a maturação dos espermatozoides. Além dessas funções, ocorre também a eliminação dos espermatozoides defeituosos e o espermatozoide adquire a capacidade de reconhecimento e conexão com o oócito (ANGRIMANI et al., 2013). A cauda do epidídimo tem a função de armazenamento das células, pois o metabolismo é baixo neste local evitando a ativação prematura das células e mantendo-as vivas (*in vivo*) por mais de 3 a 5 dias (MARADÁS et al., 2006).

3.2 Coleta de espermatozoides epididimários

A coleta adequada do sêmen a partir do epidídimo (pós orquiectomia ou pós-morte do animal) precisa ser feita com cuidado desde o momento em que o órgão é retirado até o processamento do material. O transporte e conservação do epidídimo podem ser feitos em temperatura ambiente por até 24 horas, porém, quando mantidos sob refrigeração (5°C), há uma melhor manutenção na qualidade espermática, podendo ficar viáveis por até 48 horas (HORI et al., 2009). Da mesma forma, Mota Filho et al. (2013) obtiveram bons resultados quando o deslocamento dos epidídimos foi feito com caixa térmica imersos numa solução fisiológica 0,9% e aquecido a 30°.

Após a retirada do trato reprodutivo, o mesmo é lavado para remover qualquer resíduo de sangue e depois são separados os testículos, epidídimos e ductos deferentes. Em seguida, escolhe-se a técnica de preferência para a extração desse material, podendo ser o fatiamento, flutuação, aspiração ou lavagem de ductos (ANGRIMANI et al., 2013).

Pelo método de lavagem, a cauda do epidídimo e o ducto deferente são lavados por fluxo retrógrado com solução salina e o sêmen é aspirado com seringa (ANGRIMANI et al., 2013). Já a técnica de flutuação resume-se em cortar a cauda do epidídimo e colocá-lo em um meio gelatinoso a fim de que os espermatozoides desloquem para o meio para depois serem recuperados por filtração (MONTEIRO; GUASTI; PAPA, 2009). O procedimento por fatiamento da cauda do epidídimo é um dos mais utilizados, onde o órgão recebe uma série de cortes longitudinais e transversais sendo pressionado em seguida para liberar os espermatozoides e o material extravasado então é coletado com pipeta automática (KAABI et al., 2003).

3.3 Análises físicas e morfológica do sêmen

As avaliações físicas incluem motilidade, vigor e concentração espermática e são realizadas logo após a coleta do sêmen. A concentração espermática é feita por contagem utilizando a câmara de Neubauer, a motilidade e o vigor são analisados com o auxílio de um microscópio óptico, com aumento de 100x, registrando a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e a intensidade de movimento (vigor) classificado em uma escala de 0 a 5 (CBRA, 2013).

As anormalidades morfológicas presentes nas células espermáticas são analisadas a partir das alterações na cabeça, peça intermediária e cauda do espermatozoide. Esse teste pode ser realizado em câmara úmida sob microscopia de contraste de fase ou em lâmina corada sob microscopia óptica, a partir de esfregaços do sêmen corados por exemplo com rosa bengala (CBRA, 2013).

3.4 Congelamento de sêmen

O congelamento do sêmen de cães apresenta uma grande vantagem para Medicina Veterinária atual e também para os criadores de raças. A criopreservação do ejaculado resguarda os animais do estresse de serem transportados para a cópula, de doenças

transmissíveis e também possibilita preservar materiais de alto valor genético (SILVA; CARDOSO; SILVA, 2000).

O processo da criopreservação de sêmen canino foi primeiro relatado por Rowson em 1954 (SOARES et al., 2002). Embora essa técnica tenha sido utilizada por décadas, ainda há questões a serem esclarecidas pois o método de congelamento está sujeito a várias falhas multifatoriais e também espécie-específicos. Há vários estudos tentando determinar quais os melhores métodos para trabalhar esse material, incluindo a coleta de sêmen, o meio diluente, o processamento do sêmen, a concentração final de espermatozoides, o crioprotetor, as curvas de congelamento e o método de descongelamento (CHIRINEA; SICHER; LOPES, 2013).

3.5 Meio diluente

O processo de criopreservação gera uma série de alterações consideráveis nas células espermáticas influenciando na viabilidade e qualidade espermática, sendo assim, é extremamente importante o uso de um bom diluidor que proteja a célula do choque térmico, possua nutrientes, sirva de tampão para as alterações de pH, impeça a proliferação bacteriana, sustente a concentração de eletrólitos e a pressão osmótica dentro dos parâmetros fisiológicos e possua um crioprotetor para conservar as células durante o congelamento e descongelamento (SILVA; CARDOSO; SILVA, 2000).

Os diluentes utilizados na criopreservação de sêmen canino foram adaptados de outras espécies, sendo a primeira análise entre diluentes feita por Foot em 1964. Atualmente se utilizam diluentes à base de Tris, citrato de sódio e/ou água de coco, acrescido de gema de ovo, açúcares e um crioprotetor em diferentes concentrações, sendo os mais usados na espécie canina o glicerol e o etileno glicol (SOARES, 2002).

Os agentes crioprotetores podem ser divididos em permeáveis e não permeáveis, o glicerol e etileno glicol são exemplos de meios permeáveis, pois fornecem uma proteção intracelular, modulando a membrana da célula durante as fases de transição do congelamento preservando as células (SIEME; OLDENHOF; WOLKERS, 2016). Os tipos, concentrações e modo como os crioprotetores podem ser adicionados ao sêmen podem determinar a qualidade dos espermatozoides pós-descongelamento.

Godim et al. (2009) testaram a diferença entre *one step* e *two steps*, dois métodos que especificam momentos diferentes de adicionar o crioprotetor no sêmen. O primeiro consiste em misturar o diluente no ejaculado à temperatura de 37°C e depois refrigerar por uma hora, e o segundo resume-se em adicionar o crioprotetor no sêmen pré-diluído à 5°C. Em ambas as

técnicas eles obtiveram bons resultados, verificando que não houve diferenças significativas que sugerem uma temperatura certa para o diluidor ser adicionado, sendo estas metodologias recomendadas para a criopreservação de sêmen canino.

3.6 Curva de congelação/descongelação

Há diferentes curvas de congelamento e descongelamento que visam reduzir os danos aos espermatozoides. Existem várias metodologias de congelação, variando de acordo com o diluidor, crioprotetor, temperatura e velocidade de congelamento.

Em um estudo feito por Hay et al. (1997), foram realizadas diferentes curvas de congelamento utilizando os métodos com freezer programável e vapor de nitrogênio líquido. Primeiro foi realizado um resfriamento de 0,5°C/min até -20°C e depois avaliaram cinco curvas de congelamento, sendo os melhores resultados baseado na viabilidade espermática, foram as curvas de -12°C e -28°C/min.

Da mesma forma que a congelação, há vários protocolos para descongelação, sendo a maioria realizada sob imersão em banho-maria, dando destaque para o tempo de descongelamento e as diferentes temperaturas. Além disso, é preciso tomar cuidado redobrado nessa etapa, pois é onde há mais riscos da membrana plasmática da célula ser lesionada, pela entrada de água consequente da própria descongelação e também pela ocorrência da recristalização migratória que é a modificação de micro-cristais de gelo em cristais maiores (WATSON, 1995).

Moura et al. (2013) obtiveram bons resultados na descongelação de sêmen canino a 37°C por 1min, no tocante à motilidade e viabilidade. No entanto, observaram efeitos insatisfatórios no descongelamento a 70°C por 6s, pois temperaturas altas são críticas para os espermatozoides, portanto, quando menos estresse por calor essas células passarem, menos danos serão causados.

3.7 Análises de sêmen pós-descongelação

3.7.1 Motilidade

A motilidade é o principal parâmetro para avaliar a técnica de criopreservação, junto a ação dos crioprotetores e dos diluentes. Segundo Derivaux e Barnabé (1980), a análise é feita logo após a descongelação do material espermático, com um microscópio óptico, e a interpretação é realizada a partir do percentual de espermatozoides móveis em motilidade

progressiva e a intensidade de movimento (vigor). A literatura recomenda que a motilidade espermática seja acima de 50%, entretanto, são aceitáveis amostras de até 30% para sêmen criopreservado (CONCANNON e BATTISTA, 1989; CBRA, 2013).

3.6.2 Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico é uma análise onde se coloca o sêmen em meio hiposmótico e avalia a integridade da membrana espermática ao observar o enrolamento ou não da cauda do espermatozoide. Há uma relação positiva entre o enrolamento da cauda espermática e o meio com baixas pressões osmóticas pois quando a membrana plasmática do espermatozoide se apresenta lesada há um equilíbrio osmótico entre o meio e a célula, não expressando aumento de volume celular e, assim, conservando a cauda em seu estado original. Diferente do que ocorre quando a membrana plasmática se encontra íntegra, a qual sofre um edema quando emergida em solução com osmolaridade inferior ao do seu interior, causando o enrolamento ou dobramento da cauda (JEYEDRAN; VAN DER VEM; ZANEVELD, 1992).

3.6.3 Teste Supravital

O teste supravital é também conhecido como avaliação de vivos ou mortos. Esse teste se baseia na premissa de que a membrana íntegra impede a entrada do corante no citoplasma celular. É uma técnica relativamente de fácil uso e que dispensa a utilização de microscópio especial. O modo mais utilizado é através da combinação de eosina e nigrosina, uma vez que a eosina penetra pela membrana lesionada dos espermatozoides, corando o interior do núcleo e possibilitando identificar os espermatozoides mortos (GARNER et al., 1986).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados os tratos reprodutivos (epidídimos) de dez animais adultos, da espécie canina, sem raça definida, obtidos após orquiectomia dos animais provenientes do projeto de castração desenvolvido nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

4.2 Coleta do sêmen

Após a orquiectomia dos animais, os testículos foram transportados ao laboratório de reprodução Animal em temperatura de 37°C em caixa de isopor com bolsa térmica. Em seguida foi feita uma lavagem dos órgãos com soro fisiológico aquecido para remover qualquer resíduo de sangue e depois foram separados os testículos, epidídimos e ductos deferentes e realizada a coleta do sêmen da cauda do epidídimo. A técnica de coleta foi o fatiamento do órgão, onde foram realizadas uma série de cortes longitudinais e transversais ao longo da cauda do epidídimo e em seguida a mesma foi pressionada para que houvesse um extravasamento de sêmen e lavado o material com 2 ml de solução de PBS (Tampão fosfato-salino), sendo o conteúdo coletado com uma pipeta automática em frasco de 5 ml.

4.3 Análises física e morfológica do sêmen

As análises físicas foram realizadas logo após a coleta do sêmen, utilizando uma gota de sêmen sobre a lâmina de vidro recoberta com lamínula, e com o auxílio de um microscópio óptico, avaliando a motilidade progressiva e o vigor espermático.

A concentração de células/mL foi avaliada com o auxílio da câmara de Neubauer. A avaliação morfológica do sêmen foi realizada utilizando o método de preparação em câmara úmida sob microscopia óptica de contraste de fase e o método de lâmina corada com rosa bengala, verificando a porcentagem de anormalidades dos espermatozoides em sua cabeça, peça intermediária e cauda (CBRA, 2013).

4.4 Congelamento e descongelamento do sêmen

As amostras foram diluídas em diluentes à base de TRIS-glicose (2,4g TRIS; 1,4g ácido cítrico; 0,8g glicose; 20% gema de ovo) em dois crioprotetores: 5% glicerol e 5% etileno glicol. Foi utilizada uma concentração final de 50×10^6 espermatozoides/palheta. Em seguida, as alíquotas foram envazadas em palhetas francesas de 0,25 mL (Minitub, Porto Alegre, Brasil) e congelados em máquina de congelamento de sêmen modelo TK3000 (TK equipamentos®, Uberaba, Brasil). A rampa de congelamento foi a seguinte: rampa positiva: 0,25°C/min até 5°C, rampa negativa: 5°C a -32°C = 10°C/min, -32°C a -120°C = 5°C/min, no final mergulhando no nitrogênio líquido a -196°C, sendo armazenado em botijão criogênico. O descongelamento das palhetas foi feito em temperatura de 37°C/ 30 segundos em descongelador de sêmen modelo WTA® (WTA, Cravinhos, Brasil).

4.5 Análises pós-descongelamento

As análises de motilidade e vigor foram realizadas através de microscopia óptica utilizando uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas, estimando a porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo e o vigor das células (CBRA, 2013).

O teste supravital foi feito através da coloração de espermatozoides, utilizando eosina-nigrosina, preparada com eosina Y (3,3g), nigrosina (20g), citrato de sódio (1,5g) e água destilada (300 ml) (BARTH e OKO, 1989). Para a preparação da lâmina, o corante foi aquecido à temperatura do sêmen, colocado uma gota de sêmen e uma de corante, feito o esfregaço, e posterior avaliação após secagem, em microscopia óptica. A avaliação foi feita em 100 células, verificando a porcentagem de vivos e mortos.

No teste hiposmótico foi utilizada uma solução hiposmótica de citrato de sódio (0,75g), frutose (1,35g) e água destilada (100 ml). Foi preparada uma mistura adicionando 0,1 ml de sêmen descongelado em 1 ml de solução hiposmótica e esta incubada a 37°C por uma hora. Após este período uma gota foi colocada entre lâmina e lamínula e foram avaliadas 100 células espermáticas em microscópio de contraste de fase e contado o número total de células com dobramento de cauda.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios da motilidade, vigor espermático, concentração e defeitos totais no sêmen fresco coletado do epidídimo estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Características físicas e morfológicas de espermatozoides recém coletados do epidídimo de cães.

Análises	Sêmen Fresco
Concentração (células/mL)	420 x 10 ⁶
Motilidade (%)	70
Vigor (0-5)	3
Defeitos maiores (%)	2
Defeitos menores (%)	33
Defeitos totais (%)	35

Os valores médios observados aproximam-se dos padrões encontrados na literatura para sêmen recuperado do epidídimo, sendo semelhantes aos encontrados por Hori et al. (2009), porém obtivemos uma maior porcentagem de defeitos espermáticos totais (35%) comparado aos de Hori et al. (2009) que foi de 8%. Esta observação pode ser devido a origem das amostras, onde os epidídimos coletados foram de animais que participaram do projeto de castração da Universidade Federal de Uberlândia, sendo animais sem seleção, idades variadas e sem raça definida.

A concentração média de espermatozoides obtida da diluição do sêmen epididimário com 2ml de PBS foi de 420 x10⁶ espermatozoides/mL, o que é considerada ótima para a espécie canina. Se compararmos com o ejaculado canino, que fica em torno de $247 \pm 9,9 \times 10^6$ (SILVA et al., 2002), o recuperado do epidídimo mostrou uma concentração muito mais elevada pois é um concentrado de células e não possui plasma seminal das glândulas anexas, apenas o PBS usado na lavagem do material.

A tabela 2 traz as análises de motilidade e vigor pós-descongelamento, comparando os dois crioprotetores glicerol e etileno glicol.

Tabela 2 - Análises de motilidade e vigor pós-descongelamento para os crioprotetores glicerol e etilenoglicol em espermatozoides epididimários de cães.

Análise	Glicerol	Etileno Glicol
Motilidade (%)	10	5
Vigor (0-5)	2	1

Após o descongelamento encontramos valores muito baixos de motilidade e vigor para ambos crioprotetores. Foram observados motilidade 10% e vigor 2 para o crioprotetor glicerol 5% e motilidade 5% e vigor 1 para o crioprotetor etileno glicol 5%. Fica evidente que os dois grupos apresentaram uma queda drástica em termos de motilidade progressiva e vigor espermático, no entanto, aqueles que foram diluídos com glicerol tiveram um melhor desempenho comparado com o etileno glicol.

Resultados um pouco superiores aos deste estudo foram observados por Armas et al. (2011), onde utilizando um diluidor à base de Tris-citrato-frutose-gema de ovo e glicerol a 5%, verificaram uma motilidade de $79,5\% \pm 4,97$ logo após a coleta e de $17\% \pm 7,64$ após o descongelamento. Também Hori et al. (2009) obteve resultados semelhantes utilizando o glicerol a 7% para avaliar a qualidade espermática do epidídimo canino, obtiveram uma motilidade inicial de 68,1% imediatamente após a remoção do epidídimo e depois de descongelar de 21,3%, indicando também uma queda relevante na movimentação espermática.

Apesar da queda significativa de motilidade e vigor, os espermatozoides coletados diretamente do epidídimo são considerados mais sensíveis ao congelamento, sendo normal uma diminuição considerável na integridade da membrana e na sobrevivência das células. Esta baixa resistência pode ser devido às diferenças funcionais e morfológicas entre o sêmen ejaculado e o recuperado do epidídimo, como a falta de exposição ao líquido prostático e a presença alta de gotas citoplasmáticas (LUVONI e MORSELLI, 2016).

Na avaliação dos danos causados pelo congelamento utilizando o teste supravital e o hiposmótico, apesar do glicerol ter apresentado um melhor resultado na motilidade pós-descongelamento, a diferença entre os dois crioprotetores foi pequena como mostra a tabela 3.

Tabela 3 - Análises comparativas dos testes supravital e hiposmótico para os crioprotetores glicerol e etileno glicol em espermatozoides epididimários de cães.

Crioprotetor	Teste Hiposmótico (%)		Teste Supravital (%)	
	Reativas	Não reativas	Vivos	Mortos
Glicerol	36	64	49	51
Etileno glicol	37	63	41	59

No teste hiposmótico onde se avalia a integridade da membrana plasmática da célula espermática, não houve diferença entre os diluentes. O dobramento da cauda dos espermatozoides, que indica uma membrana celular viável, foi de 36% com o glicerol e 37%

com o etileno glicol, evidenciando grande dano à membrana celular causada pelo congelamento.

No teste supravital, onde identificamos os vivos e os mortos, houve uma pequena diferença no percentual de células que foram reativas favorecendo o glicerol, o qual obteve 49% de vivos e 51% de mortos, enquanto o etileno glicol alcançou 41% de vivos e 59% de mortos, o que também mostra a alta perda de células ocorrida com o congelamento.

Nossos resultados estão de acordo com afirmado por Luvonni e Morselli (2016), em que o sêmen recuperado do epidídimo tem uma resistência menor aos danos causados pelo frio, podendo haver resultados variáveis de integridade de membrana após a criopreservação, oscilando de 5% a 60%. Assim, apesar das diferenças individuais entre os cães, como raça e idade, é de se esperar uma menor sobrevivência e integridade de membrana de células espermáticas coletadas do epidídimo.

6 CONCLUSÃO

A técnica de fatiamento do epidídimo forneceu células espermáticas em boa quantidade e qualidade.

O crioprotetor glicerol na concentração de 5% demonstrou melhores resultados de motilidade e vigor pós-descongelamento em comparação com o etileno glicol na mesma concentração.

O processo de criopreservação causou grandes lesões às membranas dos espermatozoides, comprovadas pelos testes hiposmótico e supravital.

O congelamento de sêmen do epidídimo em cães ainda é um desafio para uso desta biotecnologia na espécie e novos protocolos mais eficientes ainda precisam ser desenvolvidos.

REFERÊNCIAS

- ANGRIMANI, D. S. R.; LÚCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L.; REGAZZI, F. M.; SILVA, L. C. G.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 37, n. 4, p.323-327, 2013.
- ARMAS, S. R.; FERNÁNDEZ, V. A.; VÁSQUEZ, M. C.; SANTIANI, A. A. Determinación del tempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo em caninos post orquiectomia. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 22, n. 3, p. 199-205, 2011.
- ARROTÉIA, K. F.; GARCIA, P. V.; BARBIERI, M. F.; JUSTINO, M. L.; PEREIRA, L. A. V. The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility. In: PEREIRA, L.A.V. **Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics**. Intech, 2012. p. 42-66.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press, 1989.285 p.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- CHIRINEA, V. H.; SICHER, C. C.; LOPES, M. D. Congelamento de sêmen e sua eficiência na inseminação artificial de cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p.164-168, abril 2013.
- COCCHIA, N.; CIANI, F.; EL-RASS, R.; RUSSO, M.; BORZACCHIELLO, G.; ESPOSITO, V.; MONTAGNARO, S.; AVALLONE, L.; TORTORA, G.; LORIZIO, R. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. **Zygote**, v. 18, n. 01, p.1-8, 2009.
- CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK R.W. **Current Veterinary TherapyX: Small Animal Practice**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1989, p. 1247-1259.
- DERIVAUX, J.; BARNABÉ, R. **Reprodução dos animais domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1980.
- FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.25, n.104, p.37-40, 1964.
- GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A.; PACE, M. M. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, n.1, p. 127-138, 1986.
- GODIM, D.; CASTRO, A. C. N. D.; VIDAL, M.; FERREIRA, M. A. R.; CURY, L. J.; PINHO, T. G. Métodos de congelamento One Step e Two Steps do sêmen de cães, diluído em solução de água de coco e etilenoglicol. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 10, n. 2, p.417-422, abril 2009.

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Canine spermatozoa – cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v. 48, n. 8, p. 1329-1342, 1997.

HEWITT, D. A.; LEAHY, R.; SHELDON, I. M.; ENGLAND, G. C. Cryopreservation of epididymal dog sperm. **Animal Reproduction Science**, Hawkshead Lane, v. 67, n. 1-2, p. 101-111, julho 2001.

HORI, T.; ATAGO, T.; KOBAYASHI, M.; KAWAKAMI, E. Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality. **Journal of Veterinary Medical Science** Laboratory of Reproduction, Nippon Veterinary And Life Science University, Musashino-shi, Tokyo, Japan, p. 625-630, 2015.

HORI, T.; UEHARA, Y.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Influence of the Time between Removal and Cooling of the Canine Epididymis on Post-Thaw Caudal Epididymal Sperm Quality. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 6, p.811-815, 2009.

JEYEDRAN R. S.; VAN DER VEN, H. H.; ZANEVELD L. J. D. The hypoosmotic swelling test: an update. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 29, n. 2, p. 105-116, 1992.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, n. 7, p.1249-1259, out. 2003.

LUVONI, G. C.; MORSELLI, M. G. Canine epididymal spermatozoa: A hidden treasure with great potential. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p.197-201, 18 out. 2016.

MARADÁS, P. R.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; GRANEMANN, L. C.; SANTOS, I. W.; PIMPÃO, C. T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p.69-74, 2006.

MONTEIRO, G. A.; GUASTI, P. N.; PAPA, F. O. Coleta e preservação de células espermáticas de garanhões recuperadas da cauda do epidídimo. **Vet. e Zootec.**, v. 16, n. 3, p.448-458, 2009.

MOURA, C. S.; NUNES, A. K. S.; SILVA, B. S.; PEIXOTO, C. A.; SILVA, A. R.; SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeito da temperatura de descongelação na integridade de espermatozoides criopreservados de cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Recife, v. 65, n. 4, p.1057-1064, 2013.

MOTA FILHO, A. C.; SILVA, H. V. R.; FREITAS, L. A.; NUNES, T. G. P.; ARAÚJO, A. A.; SILVA, L. D. M. Refrigeração do epidídimo canino a 4°C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 9, p. 1155-1160, 2013.

SEVERO, N. C. História da inseminação artificial no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 39, p.17-21, 2015.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p.2-5, jun. 2016.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p.1021-1025, dez. 2000.

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação artificial em cães. In: GONÇALVES, P. B. D; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Varela, 2002. p.69-95.

SOARES, M. P.; ROSSI, C. A. R.; MEZZALIRA, A.; CECIM, M. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p.649-655, Agosto 2002.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development.**, v.7, p.871-891, 1995.