

Influência da secreção prostática autóloga sobre a viabilidade de espermatozoides caninos no pós-descongelamento

Effects of homologous prostatic secretion on post-thaw canine spermatozoa viability

CORRESPONDÊNCIA PARA:
José Luiz Rodrigues
Faculdade de Veterinária da
UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9090
Prédio 42602 - Caixa Postal 15094,
91540-000 - Porto Alegre - RS
e-mail: jlr@orion.ufrgs.br

1-Clinica Veterinária do Vale, São
Leopoldo - RS
2-Médica Veterinária Autônoma/
Estero - RS
3-Laboratório de Biotécnicas de
Reprodução da Faculdade de
Veterinária da UFRGS-RS

Berenice de Ávila RODRIGUES¹; Ana Valéria DONÁ²; José Luiz RODRIGUES³

RESUMO

Investigou-se o efeito da secreção prostática autóloga na motilidade pós-descongelamento, na integridade de acrossomo e na adesão intercelular de espermatozoides criopreservados em diluidores com TRIS-gema de ovo e com TRIS-BSA. O experimento mostrou que a adição de secreção prostática promoveu um efeito benéfico sobre a manutenção da integridade dos acrossomos. Não foram observadas alterações com referência à motilidade e à exposição dos espermatozoides frente à secreção prostática, também não levou a uma redução significativa da adesão interespermática. No entanto, após 60 minutos de incubação a 37°C, a presença da fração prostática parece ter favorecido a dissociação espermática dos ejaculados diluídos com TRIS-BSA 0,25% (60% das amostras). Ao final do período de observação, foram verificadas diferentes percentagens de sobrevivência espermática nas amostras diluídas com TRIS-gema de ovo (40% das amostras), com TRIS-BSA 0,25% (80% das amostras), com TRIS-BSA 0,50% (40% das amostras) e com TRIS-BSA 1,00% (50% das amostras).

UNITERMOS: Sêmen; Acrossomo; Cães.

INTRODUÇÃO

A avaliação da interação e do efeito do plasma seminal sobre os espermatozoides mostrou que, sob certas condições, a presença desse componente do sêmen aumenta a resistência celular ao choque térmico, além de contribuir para a manutenção da sobrevivência espermática¹⁷.

Nötling; Volkmann²³ constataram um efeito positivo da adição de secreção prostática autóloga sobre os índices de fecundação em fêmeas caninas submetidas à inseminação vaginal com sêmen crioprocessado. A adição da secreção prostática aumentou significativamente os parâmetros tamanho de ninhada, índice de concepção e índice de prenhez nas fêmeas observadas.

A secreção prostática fisiológica canina caracteriza-se por apresentar pressão osmótica igual a 300,6±14,8 MOSm/Kg. A concentração em íons de sódio e de cloreto é elevada. Possui potencial hidrogeniônico (pH) variando entre 6,0 e 7,2; é incolor e acelular^{2,11}. A presença de constituintes como zinco,

glicogênio, AMP cíclico e enzimas transformadoras de esteróides é referenciada na literatura ao lado de reduzidos teores de frutose e ácido cítrico^{2,17}.

Observações efetuadas por Ekrod⁷ e por Terhaer *et al.*³³, investigando a influência da fração prostática sobre os parâmetros de motilidade e integridade acrossômica em espermatozoides caninos descongelados, apontaram para um efeito de proteção induzido pela adição da secreção prostática que elevou significativamente o número de espermatozoides com movimento progressivo, assim como sua velocidade nas amostras avaliadas. Os autores relacionaram a elevação da motilidade espermática à alta concentração de enzimas presentes na secreção prostática, e cuja análise química permite identificar uma grande variedade: amilase, β-glucuronidase, fibrinogenase, fosfatases ácida e alcalina, deoxirribonucleases^{17,30}. O efeito da secreção seminal heteróloga sobre a motilidade e integridade acrossômica em espermatozoides equinos criopreservados foi investigado por Aurich *et al.*¹. A inclusão da secreção efetuada previamente

à criopreservação e na concentração de 30% do volume seminal mostrou um efeito benéfico sobre os parâmetros avaliados, quando o plasma seminal de garanhões com elevada motilidade espermática no pós-descongelamento era incorporado ao sêmen de animais possuidores de índices reduzidos para o mesmo parâmetro.

Outros autores relataram, no entanto, o efeito adverso do plasma seminal sobre a viabilidade espermática, observando adicionalmente que a adição da primeira ou da terceira frações do ejaculado canino à fração espermática influenciava de forma negativa a percentagem de motilidade dos espermatozoides das amostras, e determinava inclusive sua imobilidade completa dentro de períodos de incubação de duas horas^{6,8}. Multamäki *et al.*²² relacionam como fatores depreciativos na espécie humana substâncias tóxicas do plasma seminal, composição plasmática inadequada do sêmen e a presença de auto-anticorpos espermáticos circulantes, que nos humanos induz à auto-imunidade específica. Quando este fenômeno ocorre, o espermatozoide não consegue penetrar no muco cervical ou ocorre redução da motilidade durante o transporte espermático em mulheres sensibilizadas²⁰. Como resultado da presença de auto-anticorpos circulantes, é verificada aglutinação celular, condição na qual os espermatozoides móveis de um ejaculado ficam aderidos entre si²⁵. A adesão interespermática, que pode ser do tipo cabeça com cabeça ou cauda com cauda, é bastante complexa e, além do aspecto imunológico, pode ocorrer em caráter não-específico, em que os espermatozoides aderem às células presentes no plasma seminal¹⁸. Também pode ser verificada como consequência de fatores físico-químicos com atuação sobre o sêmen, tais como diluição, choque térmico, mudanças de pH e de pressão osmótica, concentração de sais derivados

de metais pesados e de certas substâncias orgânicas¹⁷. A albumina sérica bovina (BSA), uma proteína plasmática sanguínea usada na constituição de diluidores do sêmen de diferentes espécies de animais domésticos, é conhecida por suas propriedades estimulantes e preservativas sobre a motilidade espermática²¹. Seu efeito está associado à hiperflagelação celular¹⁰ e à alteração da composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide¹⁴. Através da aglutinação, podem ser observadas alterações da membrana plasmática, que conduzem à perda de motilidade espermática, embora em algumas circunstâncias essas alterações não sejam verificadas e a influência sobre a motilidade seja transitória¹⁷. Fatores designados como antiaglutininas espermáticas, presentes no plasma seminal e representados nos cães por proteínas num índice médio situado entre 40% e 65%, neutralizam e anulam as aglutinações interespermáticas^{15,30}.

Este experimento teve como objetivo verificar o efeito da adição da secreção prostática autóloga sobre a motilidade e a integridade acrossômica em espermatozoides criopreservados e adicionalmente avaliar a neutralização da adesão interespermática.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados como doadores de sêmen 6 cães das raças Pointer alemão (1), Pointer inglês (4) e Whippet (1), com idades entre 2 e 10 anos. Os machos usados no experimento foram submetidos a exame andrológico prévio, tendo sua saúde geral, genital, hereditária, potência *coeundi* e potência *generandi* comprovadas. Todos os doadores foram mantidos em canis individuais, receberam ração comercial (Pedigree Champ, Éffem Produtos Alimentícios) duas vezes

Tabela 1

Características médias da fração espermática nos ejaculados examinados (n = 20) durante o período experimental. Porto Alegre - RS, 1997.

	Aspecto	Vol (ml)	pH	Motil. %	Vigor 0-5	Concentração x10 ⁶ /mm ³	Total spz. x10 ⁶
	-	1,08	6,58	88,57	4,38	0,69	769,38
Média ± desvio	-	0,30	0,20	6,35	0,80	0,65	891,20
Mediana	leitoso	1,00	6,50	90,00	5	0,62	685,00
	aquoso						

Tabela 2

Dados médios da fração prostática dos ejaculados examinados (n=20) durante o experimento. Porto Alegre - RS, 1997.

	Aspecto	Volume (ml)	pH
Média ± dp	-	9,76	7,42
desvio padrão	-	4,23	0,36
Mediana	Aquoso	10,00	7,50

Tabela 3

Percentagem de motilidade espermática durante crioconservação nos diluidores TRIS-gema e TRIS-BSA. Porto Alegre - RS, 1997 (Multiple Range Tests-paired samples/T-test).

Diluidor	Sêmen diluído	Descongelado	
	M±dp	Fração prostática Ausente (M±dp)	Fração prostática Ausente (M±dp)
TRIS-gema (n = 6)	89,16 ^A ±4,91	40,00 ^B ±20,00	48,33 ^B ±9,83
TRIS-BSA 0,25% (n = 12)	92,50 ^A ±2,61	48,75 ^B ±27,64	36,66 ^B ±18,25
TRIS-BSA 0,50% (n = 8)	89,37 ^A ±4,17	45,00 ^B ±26,04	51,25 ^B ±14,57
TRIS-BSA 1,00% (n = 9)	88,88 ^A ±6,00	50,00 ^B ±24,10	41,11 ^B ±18,33

Tabela 4

Percentagem de alterações de acrossomo em espermatozoides descongelados na presença e na ausência de fração prostática (FP). Porto Alegre - RS, 1997 (Wilcoxon matched-pairs; signed-ranks test).

Diluidor	Alteração de acrossomo	
	FP ausente (M±dp)	FP presente (M±dp)
TRIS-gema (n = 6)	3,41±2,67	12,58±14,01
TRIS-BSA 0,25% (n = 12)	10,20±8,44	11,33±7,02
TRIS-BSA 0,50% (n = 8)	9,37±7,22	11,62±6,80
TRIS-BSA 1,00% (n = 9)	5,94±4,01	8,50±5,89

Tabela 5

Alterações de acrossomo (%) em espermatozoides caninos crioconservados em dois diluidores e submetidos à influência da adição de fração prostática (FP). Porto Alegre - RS, 1997 (Wilcoxon Matched pairs-signed ranks test e Friedmann Two-away).

Alteração acrossoma	Diluidor							
	TRIS-gema (n = 6)		TRIS-BSA 0,25% (n = 12)		TRIS-BSA 0,50% (n = 8)		TRIS-BSA 1,00% (n = 9)	
	s/ FP	c/ FP	s/ FP	c/ FP	s/ FP	c/ FP	s/ FP	c/ FP
Edema	3,41 ^a ±2,67	10,75 ^a ±11,2	6,41 ^a ±4,98	11,08 ^a ±7,00	6,81 ^a ±5,84	11,12 ^a ±6,90	4,61 ^{Aa} ±4,22	8,22 ^{Ba} ±5,35
Ausência	0 ^b	1,75 ^b ±3,06	0,16 ^b ±0,32	0,04 ^b ±0,14	0,18 ^b ±0,25	0,18 ^b ±0,37	0,16 ^b ±0,35	0,05 ^b ±0,16
Destacamento	0 ^b	0 ^b	3,54 ^{Aa} ±5,01	0,04 ^{Bb} ±0,14	2,31 ^{Aa} ±2,89	0,06 ^{Bb} ±0,17	1,11 ^a ±1,24	0,11 ^b ±0,22
Outros	0 ^b 0	0,08 ^b ±0,20	0,08 ^b ±0,19	0,15 ^b ±0,55	0,05 ^b ±0,16	0 ^b 0	0 ^b 0	0 ^b 0

A,B: Médias seguidas de letras distintas na linha num mesmo diluidor diferem estatisticamente pelo teste de Wilcoxon;

a,b: Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Friedman.

ao dia e água *ad libitum*. Entre as coletas de um mesmo doador foi mantido um intervalo de 3 a 4 dias, com o propósito de preservar a qualidade espermática das amostras^{12,27}.

A técnica empregada na coleta dos 20 ejaculados usados no experimento foi a da estimulação manual com fixação do pênis na presença de uma fêmea em estro. Os ejaculados foram

obtidos fracionadamente como a técnica permite. As frações foram acondicionadas em copos de formato tulipa graduados (3 a 4), esterilizados e aquecidos a 37°C com identificação do doador e fração coletada.

Após a coleta, uma gota de sêmen (20 µl) da fração espermática era observada entre lâmina e lamínula (18x18) previamente aquecidas sobre mesa térmica (37°C) e a identificação da atividade espermática (percentagem de motilidade e vigor) era avaliada com auxílio de microscópio óptico com aumento de 200x^{13,19}. A determinação da concentração foi efetuada com auxílio de câmara hematimétrica (Neubauer improved-depth 0,1 mm; Precicolor Alemanha). A morfologia e a integridade acrossômica espermáticas foram averiguadas utilizando-se corante constituído de solução de formol-citrato com rosa de bengala a 1,5%³² e empregando-se microscopia com contraste de fase em aumento de 1.000x. A discriminação das patologias espermáticas seguiu a classificação de Blom³, enquanto a das alterações acrossômicas obedeceu às classificações de Syväri³² e Oettlé²⁶.

Os ejaculados cuja fração espermática apresentou pelo menos 70% de espermatozoides vivos e vigor 3 foram submetidos ao congelamento²⁹. Cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas. As alíquotas da fração espermática, mantidas em banho-maria a 37°C¹¹, foram diluídas na proporção de 1:1 em diluidores com Tris-frutose-ácido cítrico contendo 6% (v/v) de glicerol e 20% (v/v) de gema de ovo¹³ e/ou em diluidores com Tris-frutose-ácido cítrico com albumina sérica bovina (BSA), contendo 2,5; 5,0; ou 10,0 mg BSA/ml de diluente e com 6% (v/v) de glicerol²⁸. Os dois diluidores eram acrescidos de penicilina e estreptomicina na concentração de 78 mg/ml (Agrovet 5.000.000 UI). A adição do crioprotetor glicerol era efetuada à temperatura ambiente e o acondicionamento do sêmen foi efetuada em palhetas de 0,25 ml, seladas com polivinil pirrolidona. O período de equilíbrio a 5°C foi estabelecido em 3 horas e 30 minutos, quando as palhetas eram mantidas em refrigerador. Para o congelamento do sêmen, foi empregado inicialmente vapor de nitrogênio (-120°C/20 minutos). A seguir, as palhetas eram imersas e estocadas em nitrogênio líquido. O descongelamento das amostras era efetuada em banho-maria a 37°C por 30 segundos. As amostras submetidas à análise da influência da secreção prostática eram acrescidas de volume igual ao das palhetas (0,25 ml), com a fração previamente descongelada à temperatura ambiente, centrifugada e submetida à isoterma com o sêmen. A observação das amostras, acrescidas ou não de secreção prostática, era efetuada imediatamente após o descongelamento. Na avaliação das amostras eram verificados a percentagem de motilidade, o vigor, a morfologia e a integridade acrossômica espermáticas. Mais adiante verificou-

se a influência da fração prostática sobre a adesão interespermática. O efeito da secreção sobre a dissociação dos espermatozoides aglutinados foi observado em diferentes tempos de incubação pós-descongelamento a 37°C (0 hora; 15; 30 e 60 minutos), de acordo com a manutenção da motilidade nas amostras seminais, nestes intervalos de tempo⁵.

Foi aplicada análise de variância para avaliação da variável quantitativa de motilidade espermática. Quando houve diferença significativa entre tratamentos, foi utilizado o teste de Tukey. Nas comparações estatísticas, empregaram-se testes não-paramétricos para a variável vigor de motilidade e alterações de acrossomo (Wilcoxon matched-pairs signed ranks test). Na análise comparativa para adesões interespermáticas foi utilizado o teste de Friedman Two-away e o teste de Kruskal- Wallis⁴. Todos os valores foram testados para o nível de significância de 5% (p≤0,05).

RESULTADOS

A análise da fração espermática e prostática dos ejaculados permitiu avaliar as características seminais médias nos reprodutores testados (Tab. 1 e 2).

Foi verificada uma percentagem de alterações espermáticas igual a 12,83% ± 14,23, das quais 5,73% ± 7,79 eram de defeitos primários, enquanto 7,09% ± 11,72 constituíam os defeitos secundários. A distribuição das alterações nos dois grupos não mostrou predominância de um defeito específico.

Motilidade e vigor espermáticos

Os índices médios comparativos para motilidade espermática (%) estabelecidos entre a pós-diluição das amostras e o pós-descongelamento nos dois diluidores testados mostraram que houve diferença estatística no comportamento dos espermatozoides para o parâmetro citado, entre essas etapas. A diferença significativa entre as etapas da pós-diluição e do pós-descongelamento foi verificada igualmente nas amostras acrescidas (p≤0,001) e naquelas destituídas de secreção prostática (p≤0,002). No entanto, nas amostras descongeladas, quando a comparação era estabelecida visando verificar a influência da adição da fração sobre a motilidade dos espermatozoides, não foram verificadas variações (Tab. 3).

A,B - Percentagens seguidas por letras distintas na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey (p≤0,05).

O vigor espermático variou durante o processo de crioconservação no diluidor com TRIS-BSA 0,25%. Foi verificada diferença estatística da pós-diluição (4,50% ± 0,52) para o pós-descongelamento com fração prostática (3,25% ±

1,13) ($p = 0,007$) e sem fração prostática ($3,00\% \pm 0,95$) ($p = 0,007$). Ficou caracterizada tendência à significância na concentração de 0,50% nas amostras destituídas de fração prostática ($p = 0,074$) nas quais o vigor variou de $4,12\% \pm 0,83$ na pós-diluição para $3,00\% \pm 1,41$ no pós-descongelamento. Também foi verificada tendência estatística à significância para o parâmetro de vigor nas amostras diluídas com TRIS-BSA 1,00% com fração prostática ($p = 0,051$), cujos valores foram de $4,00\% \pm 1,00$ na pós-diluição e de $2,77\% \pm 0,83$ no pós-descongelamento. No entanto, não pôde ser observada significância estatística entre as etapas da criopreservação no diluidor com TRIS-BSA 0,50% acrescido de fração prostática ($p = 0,138$), assim como nas amostras diluídas com TRIS-BSA 1,00% destituídas de fração ($p = 0,176$). No diluidor com TRIS-gema de ovo, foi constatada tendência à significância nas amostras com fração prostática ($p = 0,067$), nas quais o vigor variou de $4,00\% \pm 0,632$ na pós-diluição para $3,00\% \pm 0,63$ no pós-descongelamento; também nas amostras destituídas de fração prostática houve tendência à significância ($p = 0,067$), com o vigor variando de $4,00\% \pm 0,632$ na pós-diluição para $2,83\% \pm 0,75$ no pós-descongelamento. Na comparação do movimento progressivo espermático entre as amostras descongeladas acrescidas ou destituídas de fração prostática não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Acrossomo

No descongelamento das amostras acrescidas ou destituídas de fração prostática, não foi observada diferença estatística significativa sobre a percentagem de integridade acrossômica, quando os dois tratamentos eram comparados entre si (Tab. 4).

Com referência às diferentes alterações de acrossomo, foi constatada predominância para os defeitos de edema e de destacamento. O defeito edema de acrossomo mostrou diferença estatística significativa entre as amostras descongeladas acrescidas daquelas destituídas de fração prostática no diluidor com TRIS-BSA 1,00% ($p = 0,035$), enquanto nas concentrações de 0,25% ($p = 0,071$) e de 0,50% ($p = 0,068$) foi observada tendência à significância. A integridade acrossômica no diluidor com TRIS-gema de ovo foi semelhante no descongelamento para o defeito de edema, independentemente do tratamento adotado. Naqueles espermatozoides que apresentaram ausência de acrossomo, assim como naqueles classificados com outros defeitos (cisto, grânulo persistente etc.), o comportamento espermático à inclusão da fração prostática foi similar ao das amostras sem a fração.

De maneira diferente, foi verificada diferença estatística significativa para o defeito de destacamento acrossomal no diluidor com TRIS-BSA nas concentrações de 0,25% ($p = 0,034$) e de 0,50% ($p = 0,018$), quando eram comparadas as amostras acrescidas com aquelas destituídas de fração prostática. Na concentração de 1,00%, ficou caracterizada tendência à significância ($p = 0,059$). A integridade acrossômica no diluidor com TRIS-gema de ovo ($p = 1,00$) não variou nos tratamentos com ou sem fração prostática para aquele defeito. A partir da especificação de diferentes alterações acrossômicas, foi verificada a influência do tratamento (com ou sem fração prostática) sobre sua incidência. Nas amostras destituídas de fração prostática, o defeito de edema de acrossomo apresentou diferença estatística sobre os demais no diluidor com TRIS-gema de ovo ($p = 0,012$). No diluidor com TRIS-BSA 0,25%, 0,50% e 1,00%, foi observada predominância estatística dos defeitos de edema e de destacamento sobre os demais ($p \leq 0,012$). Naquelas amostras acrescidas de fração prostática, edema de acrossomo foi estatisticamente diferente dos outros defeitos, independentemente do diluidor ($p \leq 0,043$) (Tab. 5).

Aglutinação

A inclusão da secreção prostática autóloga pós-descongelamento espermático e sua influência sobre as adesões interespermáticas não mostrou neste experimento diferença estatística significativa entre as amostras ($p^{30,696}$) nos diferentes tempos de observação (0 hora, 15, 30 e 60 minutos) para os diluidores testados. Da mesma forma, quando a comparação era estabelecida entre os diluidores, para um mesmo intervalo de tempo, não foi constatada variação entre as amostras ($p^{30,286}$). Aglutinação, variando de discreta a moderada, foi observada, no entanto, nos dois diluidores no momento da primeira observação (0 hora). Na observação aos 60 minutos, a adesão espermática deixou de ser verificada em 40% (2/5) das amostras no diluidor com TRIS-gema de ovo ($n = 5$) e no diluidor com TRIS-BSA 0,50% ($n = 5$). No diluidor com TRIS-BSA 0,25% ($n = 5$), a percentagem para ausência de aglutinação foi de 60% (3/5), enquanto na concentração de 1,00% foi observado um índice de 33,3% (2/6). Movimentação espermática foi observada nos dois diluidores até 30 minutos pós-descongelamento. Aos 60 minutos, motilidade espermática esteve presente em 40% das amostras diluídas com TRIS-gema de ovo. Nas amostras diluídas com TRIS-BSA 0,25%, a persistência na movimentação foi observada em 80% delas; naquelas diluídas com TRIS-BSA 0,50%, a percentagem foi de 40%; e a movimentação esteve presente em 50% das amostras diluídas com TRIS-BSA 1,00%.

DISCUSSÃO

O plasma seminal apresenta interações específicas com os espermatozoides nas diferentes espécies de animais domésticos. Considerando-se que, na espécie canina, a próstata é a única glândula sexual acessória, é possível que sua secreção e composição estabeleçam um modo de relação particular com as células espermáticas, influenciando-as de maneira diferente às das outras espécies.

Experimentos realizados anteriormente mostraram que a secreção prostática pode contribuir favoravelmente sobre diferentes parâmetros vinculados à criopreservação espermática e à inseminação artificial nas espécies canina e equina^{1,23,33}.

Nesse experimento, a motilidade espermática sofreu redução significativa durante o processo de criopreservação nos diluidores testados, conforme observado anteriormente²⁴.

A análise comparativa das amostras descongeladas nos tratamentos com ou sem fração prostática, que revelaram índices de motilidade similares, permite afirmar que, nos diluidores, os componentes responsáveis pela estabilização e manutenção da movimentação espermática alcançaram o equilíbrio necessário à sobrevivência celular, dentro de parâmetros considerados satisfatórios à apreciação da qualidade seminal no descongelamento e que prevê uma variação ideal situada entre 50% e 60%¹³.

Com relação à percentagem de células com integridade acrossômica, não foram verificadas diferenças significativas entre as amostras descongeladas acrescidas ou destituídas de fração prostática em conformidade com os resultados de Terhaer *et al.*³³. De maneira análoga ao relatado por esses autores, a adição de secreção prostática às amostras descongeladas permitiu, contudo, a observação de um número mais elevado de espermatozoides apresentando a alteração de edema de acrossomo, ao contrário daquelas destituídas de secreção, nas quais a observação desse defeito foi semelhante ao de destacamento no diluidor com TRIS-BSA, independentemente da concentração. Esta verificação corrobora o efeito de proteção da secreção referenciado por Terhaer *et al.*³³, e sugere que a presença da BSA auxilia o efluxo lipídico através da membrana plasmática do espermatozoide, desestabilizando-a^{14,28}. Acredita-se igualmente que o efeito térmico sobre o espermatozoide, durante a etapa do descongelamento, associado à ativação das proteinases do acrossomo³¹, tenha colaborado na incidência do dano acrossômico verificado nas amostras com TRIS-BSA destituídas de fração prostática. O comportamento diferenciado observado no diluidor com TRIS-gema, em que a alteração de edema predominou sobre as demais

independentemente do acréscimo ou não de fração prostática às amostras, pode ser creditado à presença da macromolécula gema de ovo, cuja natureza de proteção não está, todavia, totalmente esclarecida⁹. É interessante realçar que o número de amostras utilizado nesse experimento foi suficiente para mostrar a influência da adição de secreção prostática autóloga sobre a integridade de acrossomo nos espermatozoides.

Estatisticamente, não foram observadas diferenças significativas à inclusão da fração prostática para dissociação da adesão interespermática, que nesse experimento poderá estar vinculada à hiperflagelação induzida pela BSA¹⁰ ou ser resultante de diferentes modificações físico-químicas de atuação sobre o sêmen¹⁷. A observação de um efeito benéfico da fração prostática sobre a dissociação não pode ser estatisticamente comprovada, ao contrário dos resultados descritos anteriormente por Lindahl¹⁵. A dissociação espermática observada no diluidor com TRIS-BSA 0,25% (60%) aos 60 minutos pode ser hipoteticamente creditada à distribuição equilibrada de íons e à manutenção da concentração celular, que teriam induzido a uma viscosidade adequada e permitiriam desse modo uma dissociação mais apropriada. A manutenção da motilidade espermática pós-descongelamento nas amostras diluídas, durante os 30 minutos iniciais da observação, estaria associada à concentração enzimática presente na secreção prostática³³. Já a diversificação alcançada aos 60 minutos da observação pode ser justificada através da baixa termorresistência do espermatozoide canino no pós-descongelamento⁵ e/ou como resultado da utilização forçada das reservas energéticas espermáticas, após a inclusão da secreção^{7,33}.

A presença de motilidade espermática verificada no diluidor com TRIS-BSA 0,25% aos 60 minutos da observação (80% das amostras) confere com observações efetuadas anteriormente, nas quais as propriedades estimulantes e preservativas da macromolécula sobre a movimentação dos espermatozoides são enfatizadas²¹ e apresenta-se em conformidade com as observações de Mahi; Yanagimachi¹⁶, que consideram essa a concentração adequada de BSA a ser incorporada nos diluidores para sêmen.

CONCLUSÃO

Os resultados verificados neste experimento mostram que a adição da secreção prostática autóloga, após o descongelamento, favorece a integridade acrossômica no espermatozoide canino criopreservado.

Não foi possível correlacionar a dissociação de espermatozoides caninos frente à incorporação de secreção prostática.

SUMMARY

Effects of homologous prostatic secretion on post-thaw motility, membrane integrity and agglutination of cryopreserved canine spermatozoa diluted in TRIS-egg-yolk and in TRIS-BSA semen extenders were investigated. The study demonstrates that the addition of prostatic secretion resulted in beneficial effect on the acrosome integrity of the spermatozoa. There weren't changes regarding sperm motility rate, and exposure of spermatozoa to prostatic secretion didn't lead to a significant reduction on sperm agglutination. However, after incubation for 60 minutes at 37°C, the addition seemed showing better sperm dissociation in TRIS-BSA 0.25% (60% of the samples). At this time, sperm survival in extenders was observed at different rates: in TRIS-egg-yolk diluent (40% of the samples), in TRIS-BSA 0.25% diluent (80% of the samples), in TRIS-BSA 0.50% diluent (40% of the samples), and in TRIS-BSA 1.00% diluent (50% of the samples).

UNITERMS: Semen; Acrosome; Dogs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryo preservation. **Theriogenology**, v.46, n.5, p.701-8, 1996.
- 2- BATT, P. Canine Semen. In: **ARTIFICIAL INSEMINATION IN DOGS**. Sydney, 1992. **Proceedings**. Sydney, Post Graduate Committee, 205, 1992. p.4.
- 3- BLOM, E. Ultrastrukturen af nogle karakteristiske spermiedefekter og forslag til et nytlassificerings-sistem for tyrens spermogram. **Nordisch Veterinary Medicine**, v.25, p.383-91, 1973.
- 4- CAMPOS, H. **Estatística experimental não paramétrica**. São Paulo : ESALQ - USP, 1983. p.233.
- 5- CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. In: KIRK, R.W. **Current veterinary therapy, small animal practice**. Philadelphia : WB Saunders, 1989. p.1247-59.
- 6- DOTT, H.M.; HARRISON, R.A.P.; FOSTER, G.C.A. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.55, p.113-24, Jan-Mar, 1979.
- 7- EKROD, B. **Untersuchungen der Spermienmotilität und der Adenosin-5-Triphosphat-Konzentration sowie der Aktivität seminaler Phosphatasen in Hundesperma**. Hannover, 1989. 78p. Tese (Doctor Medicinae Veterinarie) Klinik für Andrologie und Besamung der Haustiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- 8- ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa I. Potencial influences during processing for artificial insemination. **Theriogenology**, v.37, n.2, p.363-71, Feb., 1992.
- 9- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**. Cambridge, n.47, p.243-55, 1993.
- 10- FRASER, L.R. Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.74, n.1, p.185-96, May, 1985.
- 11- FRESHMAN, J.L.; AMANN, R.P.; SODERBERG, S.F.; OLSON, P.N. Clinical evaluation of infertility in dogs. **Compendium on Continuing Education of the Practicing Veterinarian**, New Jersey, v.10, n.4, p.443-60, April, 1988.
- 12- GÜNZEL, A -R.; KRAUSE, D. Einfluss verschiedene Entnahmefrequenzen auf Spermamermale von Beagle - Rüden. **Zuchthygiene**, Berlin, v.16, n.2, p.70-1, 1981.
- 13- GÜNZEL-APEL, A-R. **Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund**. Hannover : Gustav Fischer Verlag Jena, 1994, cap.1, p.20-31: Der Zuchtrüde. cap.3, p.84: Instrumentelle Samenübertragung.
- 14- LANGLAIS, J.; ROBERTS, K.D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Research**, v.12, p.183-224, 1985.
- 15- LINDAHL, P.E. Some factors influencing the biological activity of sperm antagglutins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.1, p.3-22, 1960.
- 16- MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. Capacitation, acrosome reaction, and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. **Gamete Research**, v.1, p.101-9, 1978.
- 17- MANN, T.; L. MANN, C. **Male reproductive function and semen**. New York : Springer Verlag, 1981. p.280: Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids: applications to andrological problems.
- 18- MENKVELD, R.; KRUGER, J. Análise seminal básica. In: BADALOTTI, M.; TELÖKEN, C.; PETRACCO, A. **Fertilidade e infertilidade humana**. Rio de Janeiro : Médica e Científica, 1997. cap.33, p.421.
- 19- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 6.ed. Porto Alegre : Sulina, 1987. v.2, p.419-70, 479-80: Tecnologia do sêmen - I.II - Diluição, conservação e transporte de sêmen.
- 20- MOGHISSI, K.S. Infertilidade sem causa aparente. In: BADALOTTI, M.; TELÖKEN, C.; PETRACCO, A. **Fertilidade e infertilidade humana**. Rio de Janeiro : Médica e Científica, 1997. Cap.12, p.146-7.
- 21- MÜLLER, A. **Einflüsse verschiedener Verdünermedien auf Motilität und Kopfkappenintegrität von flüssig Konserviertem Hundesperma**. Hannover, 1992. 66p. Tese (Doctor Medicinae Veterinarie) Klinik für Andrologia und Besamung der Haustiere der Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 22- MULTAMÄKI, S.J.; SUOMINEN, J.J.O.; DJUPSUND, B.M. Improvement of spermatozoal motility characteristics. **Archives of Andrology**, New York, v.4, n.2, p.125-32, March 1980.
- 23- NÖTLING, J.O.; VOLKMANN, D.H. Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.47, p.329-33, 1993. Suppl.

- 24- OETTLÉ, E.E. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.12, p.145-50, 1986.
- 25- OETTLÉ, E.E.; SOLEY, T. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. **Veterinary Medical Review**, v.59, p.28-70, 1988.
- 26- OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, n.47, p.257-60, 1993. Suppl.
- 27- OLAR, T.T.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. **Biology of Reproduction**, Champaign, USA, v.29, p.1114-20, 1983.
- 28- RODRIGUES, de A.B. Efeito de diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) em diluidor à base de TRIS sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado. Porto Alegre, 1997. 177p. Tese - (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- 29- ROOT, M.V.; JOHNSTON, S.D. Basics for a complete reproductive examination of the male dog. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v.9, n.1, p.41-5, February 1994.
- 30- ROSENKRANTZ, H.; LANGILLE, J.; MASON, M.M. The chemical analyses of normal canine prostatic fluid. **American Journal Veterinary Research**, v.22, p.1057-64, November, 1961.
- 31- SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J.; SEPÚLVEDA, G.; PEÑA, P.; MISKA, W. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa: effects of protease inhibitors. **Theriogenology**, Los Altos, v.43, n.4, p.761-8, 1995.
- 32- SYVÄRI, K. **Morphologische und funktionelle Untersuchungen am Akrosom der Hundesamenzelle**. Hannover, 1984. 66p. Tese - (Doctor Medicinae Veterinariae) Klinik für Andrologie und Besamung der Haustiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- 33- TERHAER, P.; GÜNZEL-APEL, A.R.; HUCHZERMAYER, B. Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma: Einflüsse definierter Glycerinendkonzentrationen auf Spermienmotilität, ATP - Konzentration und Akrosom integrität. **FOCUS**, Leicestershire, England, v.4, n.3, Focus Brief, p.1-8, 1995.

Recebido para publicação: 03/12/1997
Aprovado para publicação: 24/05/1999