

● Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmem canino, utilizando-se diluidores à base de leite e glicina gema

● *Study on the viability of cooling canine semen using milk and egg yolk glycine extenders*

Isabel Candia Nunes da Cunha¹ - CRMV-SP nº 7778

*Maria Denise Lopes² - CRMV-SP nº 2519

¹ Pós graduanda - doutorado - FMVZ - UNESP - Botucatu

² Professora Assistente Doutora - FMVZ - UNESP - Botucatu

Suporte financeiro - FAPESP

* Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ - UNESP
Botucatu - SP
Fone (0XX14) 6802-6249
e-mail: denise@fmvz.unesp.br

RESUMO

Foram utilizados 27 ejaculados de um cão, adulto, SRD, de porte médio. O sêmen foi coletado por meio de massagem peniana e dividido em três amostras iguais: GRUPO 1 (G1)-refrigerado, sem a utilização de meio diluente; GRUPO 2 (G2): diluído com meio à base de leite desnatado; GRUPO 3 (G3)-diluído com meio à base de glicina-gema, sem glicerol. As amostras foram avaliadas logo após a coleta (M0) quanto à motilidade, ao vigor espermático e à integridade das membranas espermáticas e, logo após, incubadas à temperatura de 5°C. Em seguida, as amostras foram avaliadas nos momentos: 24(M1), 48(M2) e 72(M3) horas de refrigeração, para motilidade e vigor; em M3 foi avaliada também a integridade das membranas espermáticas. A análise estatística dos dados obtidos mostrou equivalência entre o G2 e o G3, ambos superiores ao G1 quanto aos parâmetros estudados. A técnica de refrigeração mostrou-se viável, e os diluentes utilizados foram eficazes na preservação das funções espermáticas, durante o processo de refrigeração, na espécie canina.

Palavras chave: refrigeração, sêmen, cães.

Introdução

Os primeiros estudos sobre inseminação artificial foram conduzidos por Spallanzani, por volta de 1780, utilizando-se o cão como modelo experimental. A inseminação artificial (IA) de cães foi aprimorada e é ainda hoje utilizada em substituição à cobertura natural nos casos em que existe dificuldade no transporte dos animais, necessidade da cobertura de mais de uma fê-

mea com um único ejaculado ou da realização de cobertura entre cães que não se acasalam naturalmente.

O sêmen canino diluído em um extensor pode ser refrigerado por alguns dias e, quando reaquecido, utilizado para inseminação artificial com alto nível de fertilidade. Porém, se o resfriamento é realizado de modo inadequado, os espermatozoides podem sofrer o choque térmico, que induz a danos em parte irreversíveis, caracterizados por padrão anormal de motilidade (movimento cir-

cular ou retrógrado), rápida queda de motilidade, alteração da membrana plasmática e acrossômica, redução da atividade metabólica e perda de componentes intracelulares (WATSON, 1981). A refrigeração de sêmen sem um meio extensor não é indicada devido ainda às propriedades nocivas do fluido prostático e de outros componentes do plasma seminal sobre as células espermáticas (CONNCANON e BATTISTA, 1989; ROTA, 1998).

A maioria dos efeitos nocivos, causados pelo choque térmico, pode ser minimizada pelo controle da taxa de resfriamento entre temperaturas críticas e pela adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteínas (leite) ao meio diluidor (JASKO, 1994; WATSON, 1995). Muitos diluidores à base de gema de ovo e leite têm sido descritos na literatura e utilizados para a refrigeração de sêmen de cão com o objetivo principal de proteger os espermatozoides do choque térmico, fornecer-lhes nutrientes e manter o pH (PROVINCE *et al.*, 1984; ROTA, 1998; STRÖM, 1999).

PROVINCE *et al.*, (1984) obtiveram motilidade espermática de 50% pós-refrigeração do sêmen canino por 2 a 4 dias, utilizando extensores com 20% de gema de ovo, com ou sem glicerol; esses mesmos autores, em trabalho subsequente, concluíram pela não utilização do glicerol, uma vez que, em muitos casos, este exerceu um efeito depressivo sobre a motilidade do sêmen.

SÁINZ *et al.*, (1993) concluíram que o extensor TRIS-frutose-ácido cítrico com 20% de gema de ovo resultou em perda de 48,84 % da motilidade espermática, após 24 horas de refrigeração do sêmen canino. LINDE-FORSBERG (1995) comparou 269 IAs com sêmen refrigerado não diluído ou diluído em diversos extensores e obteve melhores resultados (62,5%) com utilização do extensor TRIS-gema para a refrigeração do sêmen de cão. ROTA *et al.* (1995) observaram motilidade de 50%, após 2 dias de incubação do sêmen canino a 4°C em diluidores à base de gema-creme de leite ou em gema-leite, porém, obtiveram 70% de motilidade, incubando-se em diluidor à base de TRIS-gema.

Após a refrigeração, os espermatozoides devem apresentar uma boa vitalidade para que possam atingir o local da fertilização e penetrar o óvulo; devem, também, manter a integridade de suas membranas espermáticas, um pré-requisito para sua ligação posterior com a zona pelúcida e vitelínica (ROTA, 1998, STRÖM, 1999).

Em vista do exposto, o objetivo do presente ensaio foi verificar a viabilidade do processo de refrigeração do sêmen na espécie canina, utilizando e comparando diluidores à base de leite desnatado e glicina-gema

de ovo, por meio das características de motilidade, e vigor dos espermatozoides e pela integridade das membranas espermáticas.

Material e Métodos

Foram coletados e avaliados 27 ejaculados de um cão, adulto, SRD, proveniente do Biotério Central da UNESP - Botucatu. As amostras do sêmen foram coletadas pela massagem peniana e recolhidas em funil de plástico, acoplado a um tubo de coleta graduado e aquecido a 35° C. As amostras de sêmen foram avaliadas (M0), macroscopicamente, quanto ao volume, à cor e ao odor; microscopicamente, quanto à motilidade e ao vigor, segundo método descrito por KRAUSE (1966); a concentração espermática, avaliada pela contagem das células em câmara de Neubauer, e a integridade das membranas espermáticas, através de sondas fluorescentes, sob o método descrito por CUNHA *et al.*, (1996) (Figuras 1 e 2).

Após a avaliação inicial, o ejaculado foi dividido em três partes iguais, sendo: GRUPO 1- sem a utilização de meio diluente; GRUPO 2- sêmen diluído com o meio à base de leite desnatado e glicose (KENNEY *et al.*, 1975) até obter-se um volume final de 6ml; GRUPO 3- sêmen diluído com meio à base de glicina-gema (BICUDO *et al.*, 1993), sem glicerol, até obter-se um volume final de 6ml. Após as avaliações iniciais, as amostras foram imediatamente incubadas à temperatura de refrigeração, em recipiente contendo 600 ml de água aquecida a 37° C e todo o conjunto levado à geladeira, a 5° C, propiciando, desta maneira, um ritmo de declínio de temperatura entre 0,5 e 0,2° C/min, até atingir a temperatura de 5° C (BICUDO *et al.*, 1991). O sêmen foi avaliado após 24h (M1), 48h (M2) e 72h (M3) de refrigeração após prévio aquecimento de uma amostra de cada grupo em banho-maria, a 37° C, por 10 minutos, quanto à motilidade e ao vigor espermáticos, e, no momento M3, a integridade das membranas espermáticas foi reavaliada, segundo método descrito por CUNHA *et al.* (1996) (figuras 1 e 2).

Resultados e Discussão

Os resultados das avaliações iniciais (M0) dos 27 ejaculados estudados (Figura 3) encontram-se dentro dos padrões normais para o sêmen canino (CHRISTIANSEN, 1988).

A motilidade espermática diferiu significativamente entre o grupo refrigerado sem diluição (G1) e os grupos refrigerados com diluidor à base de leite desnatado-glicose (G2) e à base de glicina-gema (G3), sendo o G2 e

o G3 equivalentes e estatisticamente superiores ao G1 (Tabela 1; Figura 4). Essa resposta foi provavelmente decorrente da proteção das células espermáticas frente ao choque térmico, oferecida pelos constituintes dos diluidores à base de leite desnatado-glicose (G2) e glicina-gema de ovo (G3) (PROVINCE *et al.*, 1984; CHRISTIANSEN, 1988; ROTA, 1998) (Tabela 1; Figura 4).

O grupo refrigerado sem diluição (G1) apresentou declínio rápido do vigor espermático atingindo escore zero (células sem movimento ou com movimento local) após 48 horas de refrigeração, diferindo dos grupos diluídos com leite desnatado-glicose (G2) e do diluído em glicina-gema de ovo (G3), que atingiram, respectivamente, vigor 3 e 2, após 48h de refrigeração. Os constituintes dos diluidores são, mais uma vez, os prováveis responsáveis pela manutenção da viabilidade espermática por um período maior (Tabela 2; Figura 5).

A comparação de taxas de concepção após I.A é ainda a melhor maneira de se avaliar a preservação de uma amostra de sêmen (LINDBER-FORSBERG, 1995); entretanto, isto nem sempre é possível. Alguns testes *in vitro* podem ser associados para permitir que a fertilidade de uma amostra seja estimada (ROTA *et al.*, 1995; CUNHA *et al.*, 1996; STRÖM, 1999). A integridade das membranas espermáticas pós refrigeração possibilita uma boa avaliação sobre a fertilidade de uma amostra de sêmen (Figuras 1 e 2) (STRÖM, 1999). Quando o sêmen

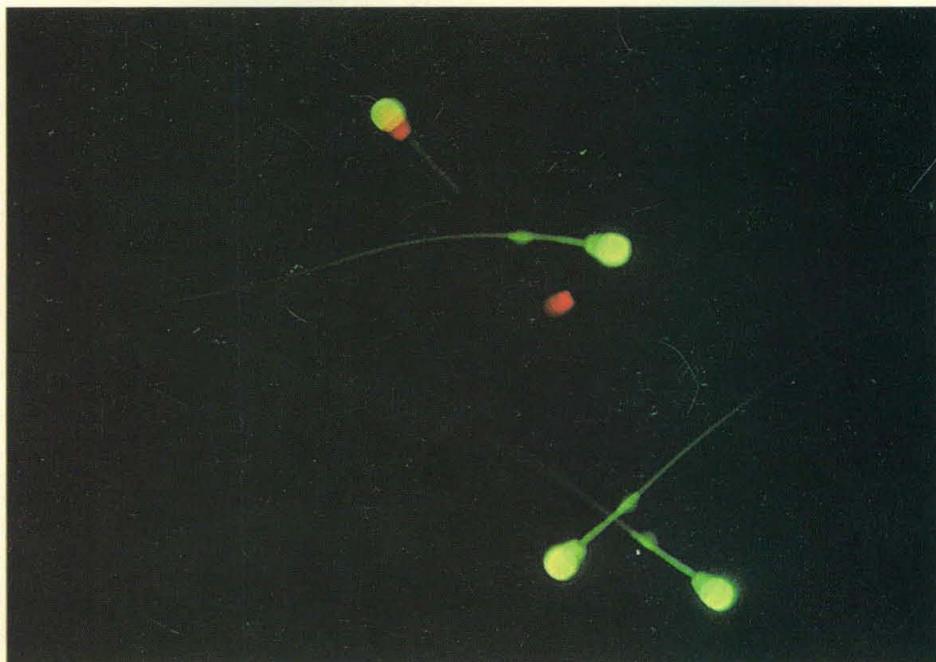


Figura 1: Espermatozoides de cão visualizados pelas sondas fluorescentes (CUNHA *et al.*, 1996): cor verde = membranas espermáticas íntegras; cores verde e vermelho = membrana plasmática lesada (vermelho) e membrana acrossômica íntegra (verde); cor vermelha = membranas espermáticas lesadas.

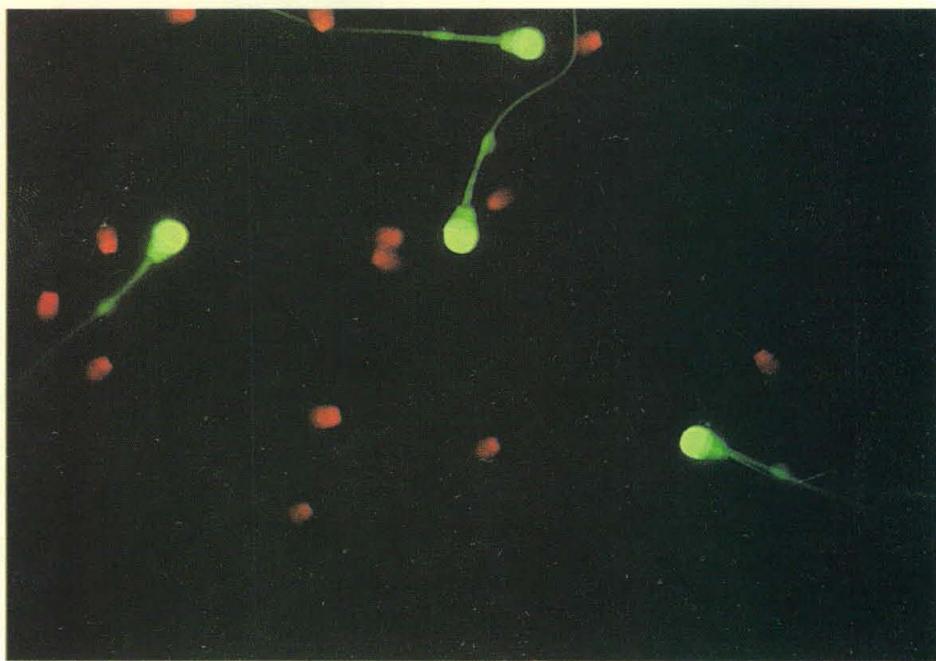


Figura 2: Espermatozoides de cão visualizados pelas sondas fluorescentes (CUNHA *et al.*, 1996): cor verde = membranas espermáticas íntegras; cor vermelha = membranas espermáticas lesadas.

foi refrigerado sem a adição de diluente (G1) observou-se 66,5% de lesão da membrana espermática, após 72h de refrigeração; em contrapartida, quando se refrigerou o sêmen em diluente à base de leite desnatado-glicose

| | Volume (ml) | Motilidade (%) | Vigor (0-5) | Concentração ($\times 10^6$ /ml) |
|---------------|----------------|-------------------|----------------|--------------------------------------|
| média | 6,7 | 74,4 | 3,68 | 63,9 |
| desvio padrão | 1,46 | 8,92 | 0,69 | 45,46 |

Figura 3: Media aritmética e desvio padrão das variáveis volume, motilidade, vigor e concentração espermática de 27 ejaculados.

(G2) ou glicina-gema (G3), observaram-se, respectivamente, 20,75% e 22,5% de lesão de membrana, indicando a proteção exercida pelos extensores às células espermáticas (Tabela 3; Figura 6).

Os resultados obtidos demonstraram uma proteção efetiva dos meios extensores sobre a integridade e viabilidade das células espermáticas.

Conclusões

O processo de refrigeração de sêmen na espécie canina mostrou-se viável até o período de 72 horas, utilizando-se diluidores à base de leite desnatado-glicose ou glicina-gema de ovo.

Os meios à base de leite desnatado-glicose e glicina-gema de ovo apresentaram resultados equivalentes no processo de refrigeração de sêmen na espécie canina, até o período de 72 horas.

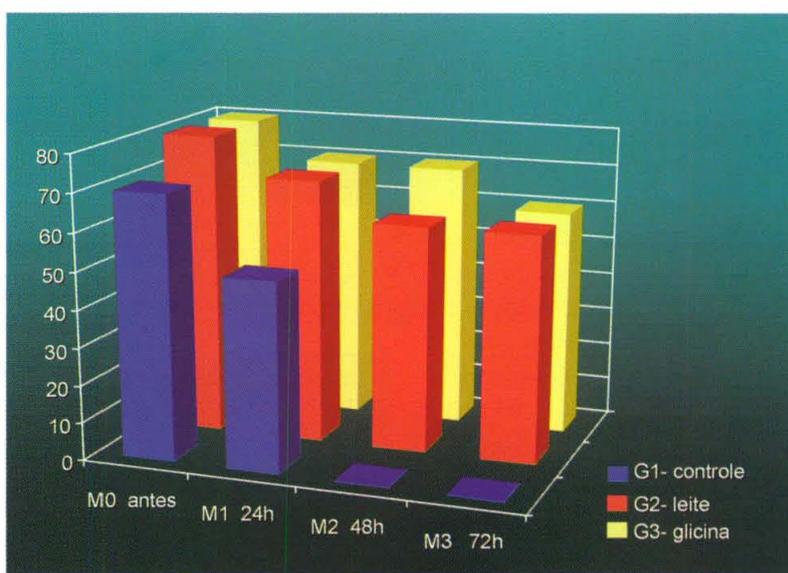


Figura 4: Comparação dos valores da mediana (Md) da variável motilidade espermática nos 4 momentos estudados, entre os 3 grupos experimentais

Tabela 1 - Comparação dos valores da mediana (Md) da variável motilidade espermática nos 4 momentos entre os 3 grupos.

| momento grupo | M0 | M1 | M2 | M3 | estatística |
|---------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| G1 | 70(A;c) | 50(A;b) | 0(A;a) | 0(A;a) | $\chi^2=66.97$ $p<0.001$ |
| G2 | 80(A;c) | 70(B;bc) | 60(B;b) | 60(B;ab) | $\chi^2=48.57$ $p<0.001$ |
| G3 | 80(A;c) | 70(B;bc) | 70(B;b) | 60(B;a) | $\chi^2=48.30$ $p<0.001$ |
| estatística | $\chi^2=3.35$ $p0.10$ | $\chi^2=40.06$ $p<0.001$ | $\chi^2=41.06$ $p<0.001$ | $\chi^2=38.74$ $p<0.001$ | |

letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre grupos ($p<0.05$)
letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre momentos ($p<0.05$)

Tabela 2 - Valores das medianas (Md) da variável vigor espermático nos 4 momentos entre os 3 grupos.

| momento grupo | M0 | M1 | M2 | M3 | estatística |
|---------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| G1 | 4(A;c) | 1(A;b) | 0(A;a) | 0(A;a) | $\chi^2=55.83 p<0.001$ |
| G2 | 4(A;b) | 3(B;a) | 3(B;a) | 2(B;a) | $\chi^2=48.38 p<0.001$ |
| G3 | 4(A;b) | 3(B;b) | 2(B;a) | 2(B;a) | $\chi^2=56.42 p<0.001$ |
| estatística | $\chi^2=1.24$ p0.50 | $\chi^2=32.17$ p<0.001 | $\chi^2=32.91$ p<0.001 | $\chi^2=37.39$ p<0.001 | |

letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre grupos (p<0.05)
letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre momentos (p<0.05)

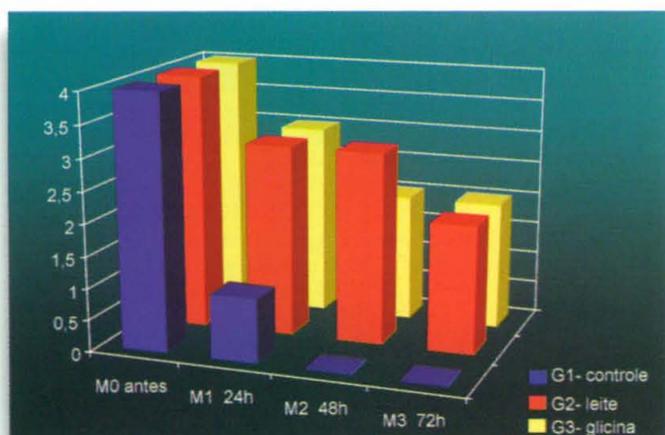


Figura 5: Valores das medianas (Md) da variável vigor espermático nos 4 momentos entre os 3 grupos.

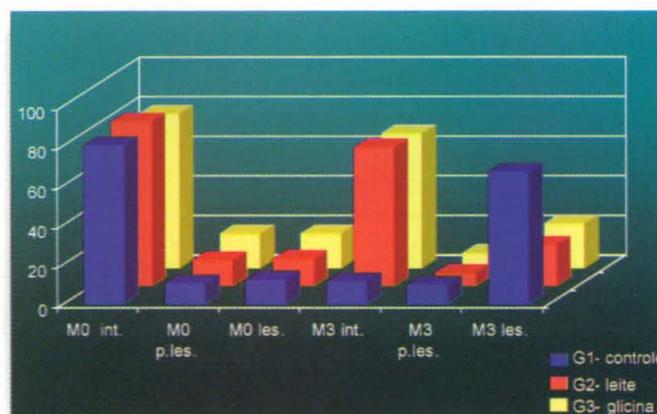


Figura 6: Comparação entre as medianas (Md) das variáveis porcentagem de células íntegras, células parcialmente lesadas e células lesadas avaliadas em 2 momentos (M0 e M3) nos 3 grupos.

Tabela 3 - Comparação entre as medianas (Md) das variáveis porcentagem de células íntegras, células parcialmente lesadas e células lesadas avaliadas em 2 momentos (M0 e M3) nos 3 grupos.

| | Integra M0 | Integra M3 | Prac.Les. M0 | Prac.Les M3 | Lesada M0 | Lesada M3 |
|----|------------|------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| G1 | 80.5 (A,b) | 11.5 (A,a) | 10.25 (A,a) | 9.75 (A,a) | 12.25 (A,a) | 66.5 (B, b) |
| G2 | 83 (A,b) | 70 (B,a) | 13.5 (AB,b) | 6.5 (A,a) | 7.75 (A,a) | 20.75 (A, b) |
| G3 | 78.5 (A,b) | 68 (B,a) | 17.5 (B,b) | 7.75 (A,a) | 10.75 (A,a) | 22.5 (A, b) |

letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre grupos (p<0.05)
letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre momentos (p<0.05)

SUMMARY

Twenty-seven ejaculates of an adult, mixed breed, medium size dog were used in this study. The semen was collected by penile stimulation and divided into three equal samples. Group 1 (G1): cooled without extender; Group 2 (G2): diluted with skimmed milk-based extender; Group 3 (G3): diluted with glycine egg yolk-based extender, without glycerol. Samples were evaluated after collection (M0) as to sperm motility and vigor, and integrity of sperm membranes, and then incubated at 5° C. Samples were again evaluated for motility and vigor after being refrigerated for 24 (M1), 48 (M2) and 72 (M3) hours. M3 also included the integrity of sperm membranes in the evaluation. Statistical analysis of the obtained data showed G2 and G3 as equivalent, both being superior to G1 in relation to the evaluated parameters. The cooling technique showed to be viable and the studied extenders were efficient in preserving the sperm functions during the cooling process of canine semen.

Key words: cooling, semen, dogs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BICUDO, S.D.; PASCHOAL, J.P.S.; RIBEIRO, E.F.R.; PAPA, F.O. Dispositivo de incubação para resfriamento de sêmen em pequenos volumes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9. Belo Horizonte: CBRA, 1991. **Proceedings**. p.365.
- 2 - BICUDO, S.D.; PAPA, F.O.; TAVARES, C.V.N.; MEIRA, C. e ALVARENGA, M.A. Glicina-Gema: proposta de um novo diluidor para congelação de sêmen bovino. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5. Lisboa, 1993. **Proceedings**. v.II, p.174-9.
- 3 - CHRISTIANSEN, J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1988, 361p.
- 4 - CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. **Current veterinary therapy small animal practice**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1989. v.10, p. 1247-59.
- 5 - CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para a avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15. Campo Grande, 1996. **Proceedings**. 1996, p.411.
- 6 - JASKO, J.D. ; Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria** v.10, n.2, p. 156-70, 1994.
- 7 - KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS. Boston, 1975. **Proceedings**, p.327.
- 8 - KRAUSE, D. **Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitäts diagnostischen Bedeutung der Bedunfe**. Hannover. 1966. 165p. Tese (Livro Docência) Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- 9 - JASKO, J.D. ; Procedures for colling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria** v.10, n.2, p. 156-70, 1994.
- 10 - LINDER-FORSBERG, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in dog. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery - Small Animal** v.10, p48-58,1995.
- 11 - PROVINCE, A.C.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**, v.22, n.4 p.409-15, 1984.
- 12 - ROTA, A.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. **Theriogenology**, v.44, n.6, p.885-900, 1995.
- 13 - ROTA, A. **Studies on preservation capacitation and fertility of dog spermatozoa**. Uppsala. 1998. Tese (doutorado) - Swedish University of Agricultural Sciences.
- 14 - SÁINZ, J.J.; JOSA, A.; ESPINOSA, E.; NIÑO JESÚS, A.; GIL, L.; MUÑOZ, J.; ETXEGARAY, A. Refrigeración del semen de perro, temperatura y tiempos de supervivencia y activación. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5. Lisboa 1993. **Proceedings**. v.II, 482-7.
- 15 - STRÖM HOLST, B. **In vitro characterisation of cryopreserved canine spermatozoa with special reference to post-thaw time and zona pellucida binding capacity**. Uppsala, 1999. Doctor's dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences.
- 16 - WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes, In: MORRIS, E.J.; CLARKE, A. **The effect of low temperatures on biological membranes**. Londres: Academic Press, 1981. p.189-218.
- 17 - WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, n.7, p.871-91, 1995.