

## ESTUDO PRELIMINAR DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN CANINO CONGELADO (*Preliminary study on some properties of canine frozen semen*)

WEISS, R.R.<sup>1</sup>; RODASKI, S.<sup>1</sup>; BÜCHELE, J.M.<sup>2</sup>; SANTOS, I.W.<sup>3</sup>; ALMEIDA, L.M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, UFPR;

<sup>2</sup>Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFPR;

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária, UFPR/Campus Palotina;

<sup>4</sup>Departamento de Anatomia, UFPR.

**RESUMO** – Na crioconservação de sêmen canino, técnicas de congelamento precisam ser otimizadas com a finalidade de maximizar a viabilidade do sêmen após a descongelação. O ejaculado de um animal foi congelado em palhetas de 0,5ml utilizando como diluidores o Tris-citrato-frutose, Tris-citrato-glucose, com 6% de glicerol no volume final, e o diluente Merk. As amostras foram avaliadas imediatamente após descongelação quanto à motilidade e integridade de acrossomas. As mais altas taxas de motilidade e integridade acrossomal foram obtidas com o diluente Tris-citrato-glucose, havendo diferenças significativas quando comparadas com os demais diluentes, demonstrando a variação na viabilidade do sêmen de um mesmo animal frente a diferentes diluidores.

**Palavras chave:** canino, sêmen, crioconservação, variação individual.

**ABSTRACT** – Current techniques for freezing canine semen ought to be improved in order to attain maximum viability from ejaculates. In the present study, three aliquots of an ejaculate from one dog has been diluted in three different extenders: TRIS-citrate-fructose, TRIS-citrate-glucose and Merck extender. Glycerol in the final concentration of 6% has been added to TRIS-citrate-fructose and TRIS-citrate-glucose extenders after the semen dilution. After the dilution, all three preparations were cooled first at 5°C and then frozen in liquid nitrogen at – 196°C. Spermatozoa motility and acrosomal integrity were assessed immediately after thawing. The values for the rate of motility and the proportion of spermatozoa displaying intact acrosome found in the TRIS-citrate-glucose preparation were significantly superior when compared with the values found for TRIS-citrate-fructose and the Merck extender.

**Key words:** dog, frozen semen, individual variation

### Introdução

A crioconservação de sêmen de cão permite aos criadores realizar o armazenamento de material genético por um período de tempo ilimitado, transmitindo características de animais de alto valor genético através de gerações e mesmo após a morte do animal. Outra razão para o uso da inseminação artificial com sêmen congelado é a possibilidade de injúrias ocorridas durante o transporte do animal ou o acasalamento, significando em demora no retorno da eficiência reprodutiva do animal, assim como animais com idade avançada ou doenças adquiridas que não estejam aptos à realizar a monta natural (STOCKNER, 1995). Possibilita o transporte do sêmen para qualquer lugar e a qualquer momento, de acordo com a fertilidade da cadela.

A baixa taxa de fertilidade quando se utiliza a inseminação intra-vaginal sugere que aqueles espermatozoides que sobrevivem ao congelamento e mantêm a motilidade após o descongelamento tem a sua capacidade fertilizante prejudicada, devido à alterações na membrana plasmática, incluindo alterações de acrossoma, e uma baixa longevidade no trato reprodutivo da fêmea (LINDE-FORSBERG, 1995; ROTA *et al.*, 1997; PEÑA *et al.*, 1998; ROTA *et al.*, 1998).

Muitos diluentes tem sido estudados para a crioconservação de sêmen canino. Diluentes à base de Tris, contendo gema de ovo, são comumente utilizados tanto em situações práticas quanto em situações experimentais com boas taxas de fertilidade (FONTBONNE e BADINAND, 1993). Atualmente, pesquisadores tem consagrado o uso do Tris-citrato-gema de ovo, com glucose ou frutose (PEÑA *et al.*, 1998). Os açúcares tem sido incluídos aos diluentes como uma fonte exógena de energia, um componente osmótico

e como agente crioprotetor (ENGLAND, 1993).

O glicerol é o crioprotetor comumente utilizado na congelação de sêmen canino e diferentes concentrações tem sido testadas nesta espécie, com os melhores resultados variando entre 2 e 8% no volume de sêmen diluído (OLAR *et al.*, 1989; ROTA *et al.*, 1998). O glicerol reduz as injúrias causados durante o congelamento, embora tenha demonstrado apresentar certa toxicidade para as células espermáticas durante a sua adição e durante a própria criopreservação (ROTA *et al.*, 1998). Um efeito adverso sobre a motilidade do sêmen canino devido a este crioprotetor também foi reconhecido por ENGLAND, (1993).

Compostos contendo "Equex STM Paste" tem sido incluídos em diluentes, de diferentes espécies, e vêm demonstrando efeitos benéficos em javalis (PURSEL *et al.*, 1978), touros (ARRIOLA e FOOTE, 1987), garanhões (MARTIN *et al.*, 1979) e ratos (PENFOLD e MOORE, 1993), melhorando a motilidade, integridade de acrossoma e conferindo melhores taxas de concepção tanto *in vitro* quanto *in vivo*. ROTA *et al.* (1997) observou, em cães, um aumento na longevidade após o descongelamento, assim como uma melhora na motilidade e na integridade da membrana plasmática quando o Equex STM Paste foi adicionado ao diluente.

TABELA 1 – GRAU DE DILUIÇÃO DO SÊMEN DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA.

CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA (10 <sup>6</sup> /ml)	GRAU DE DILUIÇÃO (volume de sêmen + volume de diluente)
300 – 500	1+3
500 – 800	1+4
>800	1+5

Para a avaliação da viabilidade do sêmen após o descongelamento, várias características de sua qualidade foram avaliadas. Um dos testes de viabilidade comumente utilizados é a avaliação subjetiva da motilidade progressiva. Na célula espermática, além da motilidade, a integridade do acrossoma é importante para os eventos da fertilização, principalmente para a fusão da célula espermática com o oócito (ROTA *et al.*, 1997).

Foi estabelecido uma variação individual na habilidade de ter o sêmen congelado entre diferentes reprodutores dentro das espécies eqüina e bovina (LARSSON e EINARSSON, 1976; COCHRAN *et al.*, 1983). DAVIES, (1982) relata efeitos similares na espécie canina. A extensão desta variação na habilidade intrínseca para uma boa viabilidade após congelamento é ainda desconhecida, porém as condições de congelamento podem ser otimizadas para melhorar uma resposta individual na sobrevivência pós-descongelamento (ENGLAND, 1993). O objetivo deste trabalho é avaliar variação

individual do ejaculado de um mesmo animal, frente à diferentes diluidores, com concentração de glicerol constante.

### Material e Métodos

Neste estudo foi utilizado um cão da raça Mastim Napolitano, com 4 anos de idade.

A colheita de sêmen do animal foi realizada através de massagem peniana. Após a colheita foi imediatamente realizado o exame macroscópico do sêmen quanto à coloração e viscosidade. Através do exame microscópico, observou-se a motilidade progressiva e vigor, segundo KRAUSE, (1966); concentração espermática através da contagem de células em câmara de Toma Nova após diluição 1:200 em solução de Formol 1%, sendo o número de espermatozoides expresso em mm<sup>3</sup>; e integridade de acrossoma através da avaliação em câmara úmida pela técnica de HANCOCK, (1957).

O ejaculado do animal, foi dividido em três alíquotas as quais foram diluídas de acordo com a concentração do sêmen (TABELA 1).

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DOS DIFERENTES MEIOS UTILIZADOS PARA A DILUIÇÃO DOS EJACULADOS.

	TRIS-CITRATO-FRUTOSE	TRIS-CITRATO-GLUCOSE
Tris	3,028g	2,24g
Frutose	1,250g	
Glucose		0,96g
Ac. Cítrico	1,780g	1,152g
Gema de Ovo	20%	20%
Água Bidestilada (q.s.p.)	100ml	100ml

Para a diluição foram utilizados os diluidores Tris-citrato-glucose, Tris-citrato-frutose (TABELA 2), acrescentando-se glicerol após a diluição do sêmen, a fim de obter uma concentração final de 6% sobre o volume total e o diluente II Merk (TABELA 3).

Após a diluição do sêmen, foi realizada uma nova avaliação microscópica para a avaliação da motilidade progressiva. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml e permaneceu durante 2h à temperatura de 5° C. O congelamento foi efetuado depositando as palhetas em posição horizontal sobre uma grade suspensa 3 cm do nível de nitrogênio líquido durante 10 minutos e em seguida mergulhadas no nitrogênio líquido à

temperatura de -196°C para estocagem.

Duas palhetas de cada amostra de sêmen com os diferentes diluentes foram descongeladas em água à 38°C durante 1 minuto. Imediatamente após o descongelamento foram avaliadas quanto à motilidade progressiva e integridade de acrossoma.

### Resultados

Sêmen fresco apresentou motilidade progressiva de 85%, vigor 4, coloração esbranquiçada e viscosidade leitosa. A concentração espermática foi  $885 \times 10^6/\text{cm}^3$  e a taxa de acrossomas íntegros 93%.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO DILUENTE MERK, UTILIZADO PARA DILUIÇÃO DO SÊMEN.

	DILUENTE I	DILUENTE II (ml)
Glucose	3g	
EDTA	0,185g	
Bicarbonato	0,060g	
Citrato de Sódio	0,188g	
Água bidestilada (q.s.p.)	50ml	
Diluyente 1		25
Lactose 11%		50
Gema de ovo		20
Glicerol		5
Equex STM Paste		0,8

Após congelação a maior taxa de motilidade progressiva e menor número de alterações no acrossoma foi encontrado nas amostras diluídas com Tris-citrato-glucose e os menores

índices de motilidade progressiva e integridade de acrossoma foram encontrados nas amostras diluídas com o diluente Merk conforme TABELA 4.

TABELA 4 – VALORES DE MOTILIDADE PROGRESSIVA E INTEGRIDADE DE ACROSSOMA APÓS CONGELAMENTO DO SÊMEN COM OS DIFERENTES DILUIDORES.

Meios utilizados	Motilidade progressiva		Integridade de acrossoma	
	PD*	PC*	SF*	PC*
Tris-citrato-glucose	85% <sup>a</sup>	65% <sup>A</sup>	93% <sup>a</sup>	65% <sup>A</sup>
Tris-citrato-frutose	80% <sup>a</sup>	25% <sup>B</sup>	93% <sup>a</sup>	45% <sup>B</sup>
Diluyente Merk	85% <sup>a</sup>	5% <sup>C</sup>	93% <sup>a</sup>	30% <sup>B</sup>

\*PD – Pós-diluição; PC – Pós-congelamento; SF – Sêmen fresco.

Houve uma diminuição de 28% nos acrossomas intactos e de 20% na motilidade progressiva, após congelação, nas amostras com Tris-citrato-glucose. A diminuição nos acrossomas intactos foi de 48% e 63% para Tris-citrato-frutose e diluente Merk, respectivamente, e a diminuição na motilidade progressiva foi de 60% para o Tris-citrato-frutose e 80% para o diluente Merk (FIGURA 1).

### Discussão

Atualmente, grupos de pesquisadores e práticas institucionais tem consagrado o uso do Tris-citrato-gema de ovo na criopreservação do sêmen de canino, adicionado de glucose ou frutose e envasado em palhetas de 0,5ml (OLAR, 1984; MORTON, 1988). A solução de lactose com gema de ovo tem sido amplamente utilizada

no congelamento de sêmen de inúmeras espécies. Este açúcar, de alto peso molecular, tem baixa permeabilidade e é também considerado um crioprotetor (ENGLAND, 1993).

A adição do Equex-STM-Paste ao diluente contendo gema de ovo foi demonstrado por muitos autores por aumentar a qualidade e longevidade do espermatozóide de várias espécies após descongelação (ROTA *et al.*, 1997; PEÑA *et al.*, 1998). Sua ação crioprotetora tem sido sugerida pela solubilização dos lipídios protetores da gema do ovo (PENFOLD e MOORE, 1993).

Entretanto, no presente estudo, utilizou-se o diluente Merk (MARTIN *et al.*, 1979) contendo uma solução de lactose e Equex-STM-Paste, apresentando resultados insatisfatórios.

A diminuição do número de acrossomas íntegros encontrado nas amostras diluídas com Tris-citrato-glucose adicionado de glucose está de acordo com TERHAER (1993), quando relata uma diminuição de até 30% na porcentagem de acrossomas íntegros do sêmen após descongelação. No entanto, quando utilizou-se o Tris-citrato-frutose os resultados foram muito abaixo do esperado, em discordância com o mesmo autor.

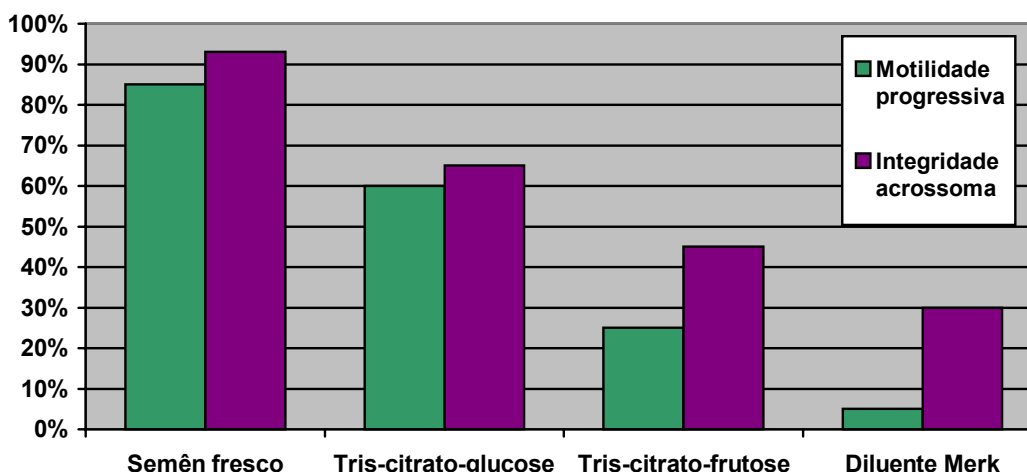


FIGURA 1 – MOTILIDADE PROGRESSIVA E ACROSSOMAS INTACTOS NO SÊMEN FRESCO E APÓS CONGELAMENTO COM OS DIFERENTES DILUENTES.

Sugere-se que as diferentes respostas, encontradas neste estudo, frente aos diferentes diluidores deva-se à variação individual. DAVIES, (1982), encontrou diferenças entre reprodutores caninos na habilidade de congelamento do sêmen, contudo, não foi estabelecida uma relação entre esta habilidade e as influências de determinadas raças. Segundo ENGLAND, (1993), a extensão na variação na habilidade intrínseca das células em sobreviver ao congelamento é ainda desconhecida, mas variações nas condições de congelamento podem melhorar tal habilidade.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRIOLA, J.; FOOTE, R.H. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *Journal of Dairy Science*, v.70, p.1664- 1670, 1987.
- COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Fertility of frozen thawed stallion semen extended in lactose-EDTA-egg yolk extender and package in 1,0ml straws. *Theriogenology*, v.20, p.735-741, 1983.
- DAVIES, P.R. *A study of spermatogenesis, rates of sperm production and methods of preserving the semen of dogs*. Sydney, 1982, 84p. Tese, University of Sydney, Australia, 1982.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog sêmen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.47(Suppl.), p.243-255, 1993.
- FONTBONNE, A.; BADINAND, F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.47(Suppl.), p.325-327, 1993.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *Journal of Research Microscopy Society*, v.76, p. 84-97, 1957.
- KRAUSE, D. *Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde*. Tese livre docência. Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1966, 165p.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Influence of boars in the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Veterinaria Scandinava*, v.17, p.74-82, 1976.
- LINDE-FORSBERG, C. *Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog*. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal), v.10, n.1, p.48-58, 1995.

- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.27(Suppl.), p.47-51, 1979.
- MORTON, D.B. Artificial insemination with frozen semen in the dog: principles of "DNA fingerprinting". In: JONES, D.E., JOSHUA, J.O. **Reproductive Clinical Problems in the Dog**, Wright, 2 ed. London. 1988, p. 169-186.
- OLAR, T.T. **Criopreservation of dog spermatozoa**. PhD Tesis, 104 p. 1984, Colorado State University, Colorado, USA.
- OLAR, T.T.; BOWEN, R.A.; PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post thaw motility on canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v.31, p.451-461, 1989.
- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Effects of sodium dodecil sulphate on post-thaw dog sêmen quality during *in vitro* incubation at 39°C and 22°C. **Reproduction of Domestic Animal**, v.33, p.393-398, 1998.
- PENFOLD, L.M.; MOORE, H.D.M. A new method for cryo-preservation of mouse spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, p.131-134, 1993.
- PURSEL, V.G.; SCHULMAN, L.L.; JOHNSON, L.A. Effect of Orvus ES Paste on acrossome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. **Journal of Animal Science**, v.47, p.198-202, 1978.
- ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1997.
- ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J.; ROMAG-NOLI, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing-thawing rates. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 33, p.355-361, 1998.
- STOCKNER, P.K. Status of the canine frozen semen industry. **Modern Veterinary Practica**, v.66, n.2, p.98-100, 1985.
- TERHAER, P. **Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma: Motilität, ATP-Konzentration und Akrosomintegrität der Spermien bei Zusatz unterschiedlicher Glycerinkonzentrationem sowie von Seminalplasma zum verdünnten bzw. Aufgetauten Samen**. Hannover, Alemanha, 1993, 89p. Tese livre docência. Tierärztliche Hochschule, Hannover.