

CONGELAÇÃO DO SÊMEN CANINO COMPARANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL E DIFERENTES TEMPOS DE EQUILÍBRIO
(Freezing of canine semen comparing different glycerol concentrations and cooling-off periods)

SANTOS, I.W.¹; LIMA, V.F.M.H.²; BINSFELD, L.C.³; RIBEIRO, A.P.C.⁴

¹Doutorando em Reprodução Animal – UNESP – Jaboticabal, SP, iwalterdossantos@yahoo.com.br;

²Professora Adjunto DMVPRP – UNESP – Jaboticabal, SP;

³Técnico Laboratório de Reprodução Animal- UFPR – Palotina, PR;

⁴Mestranda em Cirurgia Veterinária – UNESP – Jaboticabal, SP.

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi estudar a concentração de glicerol e tempo de equilíbrio para congelação de espermatozoides caninos diluídos em Tris-Gema. Vinte cães serviram como doadores sendo estimulados por massagem peniana. Semanalmente colheu-se a fração rica sêmen até a obtenção de 20 pools (3 ejaculados/pool). Após a avaliação macro e microscópica, o pool foi dividido em 4 partes iguais e diluído em amostras de Tris-gema adicionado de 4, 6, 8 e 10% de glicerol respectivamente, pelo método “one step”, à temperatura de 37°C. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml permanecendo em equilíbrio a 4°C por 1, 2, 3 e 4 horas, sendo então colocadas em vapor de nitrogênio líquido (N₂) por 15 minutos e posteriormente mergulhadas e, então, raqueadas e armazenadas em botijão criobiológico. A descongelação foi feita a 37 °C por 30 segundos retirando-se uma alíquota para avaliação da motilidade, vigor e retenção acrossomal; o restante do sêmen foi incubado em banho Maria a 39 °C por até 4 horas para teste de termo-resistência (TTR). Os melhores resultados pós-descongelação de motilidade (P <0,0001), vigor (P < 0,0008), retenção acrossomal (P < 0,04), e ttr (P < 0,01) foram obtidos com 8% de glicerol (P<0,0001) e 1 hora de equilíbrio.

Palavras chave: Sêmen, cão, glicerol, tempo de equilíbrio.

ABSTRACT – The aim of this study was to evaluate the glycerol concentration and the time of freezing equilibrium for the canine spermatozoa diluted in TRIS-yolk. Twenty dogs served as donors and were stimulated by penis massage. Only the rich fraction of the ejaculated fluid was weekly collected until 20 pools were obtained (3 ejaculates / pool). Following macroscopic and microscopic evaluation, the pool was divided in 4 parts and diluted in different samples of TRIS-yolk extender at 4, 6, 8 and 10% of glycerol concentration respectively, using the “one step” method at 37°C. These samples were packed in 0.5 ml straws and kept for 1, 2, 3 and 4 hours at 4 °C, followed by 15 minutes in nitrogen vapor, then immersed in liquid nitrogen and kept in cryobiologic bottle. The thawing step was carried out for 30 seconds at 37 °C. A semen aliquot was used to evaluate the motility vigor and acrossomal retention and the remaining was incubated in water bath at 39°C up to 4 hours for TTR (test of thermal resistance). The best post-thawing results of motility (P < 0.0001), vigor(P < 0.0008), acrossomal retention (P < 0.04) and ttr (P < 0.01) were obtained with 8% of glycerol concentration (P <0.0001) and 1 hour of cooling-off.

Key words: Semen, dog, glycerol, cooling-off period.

Introdução

Crioprotetor: O sucesso da criopreservação do sêmen canino é afetado por muitas variáveis, incluindo-se o potencial tóxico do agente crioprotetor, particularmente relativo a concentração, duração e a temperatura em que

o sêmen é exposto ao crioprotetor. Na maioria dos protocolos desenvolvidos para a criopreservação espermática, o glicerol é o agente mais utilizado, variando grandemente entre as espécies, sendo que a concentração ideal é freqüentemente comprometida entre o efeito crioprotetor e a toxicidade. Como nas

demais espécies, a ausência do glicerol durante a criopreservação do espermatozóide canino reduz significativamente a recuperação espermática na pós-descongelção. Vários pesquisadores têm descrito o uso do glicerol, variando-se a concentração de 2 a 16% para criopreservação do sêmen canino, dependendo da composição do diluidor usado. O glicerol na proporção de 8 a 9% possibilita motilidade pós-descongelção de 40 a 70%. O glicerol tem sido comparado com dimetil sulfoxido (DMSO) para criopreservar espermatozóide canino. O uso do DMSO isoladamente ou associado ao glicerol para criopreservar o sêmen canino, não é melhor do que o glicerol isolado. A crioproteção do glicerol tem sido avaliada pela motilidade espermática na pós-descongelção. A integridade acrossômica e longevidade do sêmen canino pós-descongelado e incubado a temperatura fisiológica em diferentes concentrações de glicerol ainda é pouco estudado (PEÑA *et al.*, 1998). Estes autores compararam concentrações de 2, 4, 6 e 8% de glicerol e glicerolização a temperaturas de 37°C e 4°C para congelação do sêmen canino, e concluíram que a glicerolização a 37°C na proporção de 8%, proporcionaram os melhores índices de motilidade, viabilidade e morfologia espermática na pós-descongelção.

OLIVEIRA *et al.* (1999) usaram o glicerol como crioprotetor na proporção de 6% e adicionaram aos diluidores tris-gema e lactose-gema observando redução significativa na motilidade e vigor do sêmen descongelado.

MIES FILHO (1987) e FARSTAD (1996) preconizam o uso do glicerol na concentração de 8% adicionado ao diluente tris-gema a 37°C, e obtiveram os melhores índices de motilidade e vigor no sêmen descongelado.

WEISS *et al.* (2000) congelaram espermatozóides de cão usando glicerol a 6% e equex 0,4%, com bons resultados de motilidade, vigor e retenção acrossômica no sêmen pós-descongelção.

SILVA *et al.* (2003) avaliaram a glicerolização única (one step) ou fracionada do sêmen canino diluído em tris-gema e concluíram que não houve diferença estatística entre os dois métodos em relação à morfofisiologia do espermatozóide pós-descongelado, recomendando o método one step frente à sua

facilidade.

Outros crioprotetores, como o hidroxitolueno butilado estão sendo testados mostrando boa proteção contra as injúrias causadas pelo choque térmico (FARSTAD, 1996).

Tempo de Equilíbrio

As alterações físicas e químicas na membrana celular causadas pelo resfriamento, podem ser irreversíveis e diferem daquelas causadas pelo congelamento e descongelamento. Os danos do choque frio e congelação podem ser considerados fenômenos separados. As alterações irreversíveis na membrana do espermatozóide (distúrbios na estrutura lipídica e protéica), tais como, aumento da permeabilidade, danos acrossomais, desidratação e redução da enzima fosfolipídica, atividade metabólica reduzida e diminuição do consumo de ATP, são conseqüências de refrigeração e congelação, as quais, podem parcialmente ou totalmente, comprometer a fertilidade do sêmen. A curva lenta de resfriamento e congelação do sêmen canino de 5°C/min. de +3°C a -157°C, tem proporcionado as melhores porcentagens de motilidade pós-descongelção quando comparada com a curva intermediária (8°C/min. de +3°C a -164°C) e a curva rápida (18°C/min. de +3°C a -191°C), todas com descongelção a 37°C/2 minutos (FARSTAD, 1996). STRÖM *et al.* (1997) preconizam um regime de resfriamento do semen a 4°C/2 horas e congelação no vapor de N₂ a 4 cm acima da superfície, numa curva de congelação de 13°C/min. de +4 a -15°C, 25°C/min. de -15°C a -35°C e 12°C/min. de -35°C a -100°C. HAY *et al.* (1997) resfriaram sêmen canino por 2 horas a 4°C e congelaram de acordo com o seguinte protocolo: As palhetas foram colocadas em refrigerador a álcool programado para 0,5°C/min. até -20°C e 2°C/min. de -20°C a -70°C, quando as palhetas foram mergulhadas em N₂. FARSTAD (1998) refrigerou sêmen canino por 2 horas a 4°C e congelou em vapor de N₂ a 4 cm da superfície por 8 min. com a seguinte curva: 2°C/min de +4°C a -7°C, 50°C/min. de -7°C a -100°C e 25°C/min. de -100°C a -180°C. Após as palhetas foram mergulhadas diretamente em N₂. PEÑA *et al.* (1998)

Congelamento do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio

congelaram sêmen canino após refrigeração a 4°C por 2 horas. As palhetas permaneceram no vapor de N₂ por 10 min. a 6 cm da superfície de N₂, conforme a curva de 15°C/min de +4°C a -15°C, 35°C/min. de -15°C a -40°C e 11°C/min. de -40°C a -80°C e após mergulhadas em N₂.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a melhor concentração de glicerol e o tempo de equilíbrio 4°C, na congelação do sêmen canino diluído em Tris-Gema.

Material e Método

O experimento foi desenvolvido no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP/Jaboticabal (SP) e, dependências do Hospital Veterinário da faculdade de Medicina Veterinária da UFPR/Palotina (PR).

Andrologicamente foram avaliados cães de diferentes raças: Boxer (6), Colie (3), Rot Weiler (3), Pastor (2) e sem raça definida (SRD) (6) e que apresentavam saúde geral diagnosticada por exame clínico, pesando entre 20 a 40 Kg/PC (peso corporal) e com idade de 2 a 5 anos.

Após a higienização do prepúcio com solução

fisiológica, os cães eram estimulados pelo método da massagem peniana e somente a fração rica do ejaculado era colhida em tubo graduado acoplado a um funil plástico. A frequência de colheita foi de uma vez por semana, por cão até que se obteve um mínimo de 20 "pool" (3 ejaculados/pool).

Imediatamente após a colheita do sêmen determinou-se o volume e o aspecto, e em seguida realizou-se o exame microscópico entre lâmina e lamínula para determinar o vigor (0-5) e a motilidade progressiva (%) em microscópio de contraste de fase (Olympus-BX41TF-Japão). A concentração foi realizada em câmara de Neubauer, com sêmen diluído 1:100 em formol salina, sendo que após a contagem, o cálculo final foi processado pela fórmula de KRAUSE (1966). Os defeitos maiores e menores foram avaliados conforme (OETTLE e SOLEY, 1988). O pool foi dividido em 4 partes e cada uma foi diluída, à temperatura de 37°C, na solução mãe (SM), tris 2,900gr, glicose 1,226gr, ácido cítrico 1,735gr, penicilina G 0,06g, estreptomicina 0,1g, água bidestilada qsp 100 ml, acrescida de gema e diferentes concentrações de glicerol conforme mostra-se QUADRO 1.

QUADRO 1 – VOLUME DOS COMPONENTES DO DILUENTE PARA ATESTAR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL NO SÊMEN DE CÃO. JABOTICABAL (SP), 2002.

Frações do pool	Componentes do Diluente		
	Glicerol %	SM %	Gema de ovo %
1 ^a	4	76	20
2 ^a	6	74	20
3 ^a	8	72	20
4 ^a	10	70	20

Depois da diluição, verificou-se a motilidade e o vigor; em seguida eram envasadas 8 palhetas de 0,5 ml, permanecendo-as por até

4 horas em geladeira após a temperatura do sêmen ter atingido 4°C, como é visto no QUADRO 2.

QUADRO 2 – CONGELAÇÃO DE SÊMEN CANINO EM QUATRO DIFERENTES TEMPOS DE EQUILÍBRIO. JABOTICABAL (SP), 2002.

Congelação	Tempo de equilíbrio 4°C			
	1 hora	2 hora	3 hora	4 hora
2 palhetas	X			
2 palhetas		X		
2 palhetas			X	
2 palhetas				X

A congelação foi feita de acordo com a metodologia descrita por FARSTAD (1996).

As palhetas foram descongeladas em banho maria a 37°C por 30 segundos; em seguida o sêmen foi transferido para tubo graduado de onde retirava-se uma porção para avaliação da motilidade, vigor e retenção acrossomal, conforme OETTLE e SOLEY (1988). O restante do sêmen era incubado em banho maria a 39°C para o teste de termo-resistência (ttr) por até 4 horas.

Os dados resultantes das concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio foram analisados pela ANOVA com aplicação do teste de Tukey.

Resultados

Os resultados das diferentes concentrações

de glicerol apresentaram diferença em relação a motilidade ($P < 0.0001$), sendo que as concentrações de 6 e 10% não apresentaram significância estatística.

O vigor foi altamente significativo ($P < 0,0001$) entre 8% e as demais concentrações, as quais não foram diferentes entre si.

A retenção acrossomal apresentou alta significância entre as concentrações de 4, 6, 8 e 10% ($P < 0,0001$).

No teste de termo-resistência não foi observado diferença significativa entre as concentrações de 6 e 10%, porém, 8% foi altamente significativo em relação as demais ($P < 0,0001$).

Os resultados das variáveis acima descritas estão, dispostas na TABELA 1.

TABELA 1 – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PÓS-DESCONGELAÇÃO DO ESTUDO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL PARA A FORMULAÇÃO DE DILUENTES UTILIZADOS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO.

Glicerol %	Média Motilidade (%)	e vigor (0-5)	Desvio ret. across. (%)	Padrão TTR (%)
4	30,500 ^c (6,851)	2,000 ^b (0,000)	61,600 ^d (3,533)	7,200 ^c (2,485)
6	45,500 ^b (4,972)	2,000 ^b (0,000)	81,000 ^b (3,620)	10,000 ^b (0,000)
8	58,000 ^a (5,869)	2,700 ^a (0,483)	91,300 ^a (1,418)	17,000 ^a (2,581)
10	40,500 ^b (6,433)	1,700 ^b (0,485)	67,500 ^c (6,346)	8,000 ^{bc} (2,581)

($P < 0,0001$) a, b, c, d, as colunas com médias seguidas por letras diferentes indicam significância pelo teste de Tukey.

De acordo com a tabela acima, diversas informações podem ser obtidas das diferentes concentrações de glicerol, sendo que 8%, mostrou-se mais efetiva em relação aos valores de motilidade, vigor, retenção acrossomal e teste de termo-resistência.

Tempo de Equilíbrio

O tempo de equilíbrio apresentou diferentes valores de média e desvio padrão no sêmen descongelado em relação às seguintes variáveis:

Na motilidade, observou-se que houve diferença estatística de alta significância ($P < 0,0001$) entre 1, 2, 3 e 4 horas de equilíbrio.

No vigor e na retenção acrossomal não houve diferença estatística entre 1, 2 e 3 horas, porém, entre 3 e 4 horas a diferença foi significativa ($P < 0,0008$) e ($P < 0,04$)

respectivamente.

O teste de termo-resistência mostrou-se não diferente entre 1 e 2 horas de equilíbrio. Diferença significativa ($P < 0,01$) entre 2, 3 e 4 horas foi observado.

Os resultados do experimento com tempo de equilíbrio a 4° C de temperatura, estão apresentados na TABELA 2.

A TABELA 2 indica que a partir de 2 horas de equilíbrio, o sêmen canino apresenta redução significativa pós-descongelação no exame final (TTR).

Discussão

Crioprotetor: O glicerol é o agente crioprotetor mais utilizado para a congelação de sêmen canino, porém, a sua concentração no diluidor é polêmica entre os pesquisadores. Neste trabalho a concentração de 8% de glicerol pelo

Congelação do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio

método "one step", foi a que melhor preservou os espermatozoides canino pós-descongelamento (TABELA 1), em relação à motilidade, vigor,

retenção acrossômica e TTR, corroborando com os resultados descritos por PEÑA *et al.* (1998), MIES FILHO (1987), FARSTAD (1996).

TABELA 2 – MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DAS VARÁVEIS DO SÊMEN CANINO DESCONGELADO, SUBMETIDO A DIFERENTES TEMPOS DE EQUILÍBRIO (N=10 POOL).

Tempo de Equilíbrio	Variáveis			
	Motilidade %	Vigor 0-5	Ret. Acrossomal %	TTR %
1 hora	64,000 ^a (3,838)	3,000 ^A (0,000)	92,350 ^A (3,202)	19,500 ^a (1,538)
2 hora	58,000 ^b (4,973)	3,000 ^A (0,000)	92,250 ^A (0,759)	17,500 ^a (3,034)
3 hora	53,000 ^c (5,938)	3,000 ^A (0,000)	92,050 ^A (0,825)	13,250 ^b (2,935)
4 hora	45,500 ^d (6,261)	2,700 ^B (0,470)	91,800 ^B (0,833)	10,750 ^c (2,446)

(P<0,0001) a, b, c, d, (P<0,0008) A, B, (P<0,04) A, B, (P<0,01) a, b, c. As colunas com médias seguidas por letras diferentes, indicam significância pelo teste de Tukey.

Segundo OLIVEIRA *et al.* (1999), o glicerol a 6% adicionado a diluidores Tris-gema e Lactose-gema reduziu significativamente a motilidade e o vigor dos espermatozoides descongelados, assemelhando-se aos resultados obtidos neste trabalho (TABELA 1). Por outro lado, WEISS *et al.* (2000), relatam que os melhores resultados de motilidade, vigor e retenção acrossômica foram obtidos com diluente Tris-gema acrescido de 6% de glicerol, diferentes dos achados acima descritos. Esta variação pode ser atribuída à concentração diferente açúcares utilizados na formulação do diluente preconizado pelos referidos autores.

Tempo de Equilíbrio

A estabilização do sêmen com o meio diluidor, é de fundamental importância para manter a integridade da membrana do espermatozoide durante o processo de congelação. O tempo e a temperatura desta etapa do processamento do sêmen divergem entre pesquisadores. Neste trabalho, foi observado que os melhores resultados de motilidade, vigor, retenção acrossômica e TTR foram obtidos com 1 hora de equilíbrio a 4°C de temperatura. Exceto o TTR, que permaneceu inalterado por até 2 horas, as demais variáveis acima, diminuíram proporcionalmente após a primeira hora de equilíbrio por até 4 horas (TABELA 2). Este fato pode ser atribuído à ação tóxica do glicerol quando o espermatozoide é exposto por muito tempo. Logo, uma hora é suficiente para estabilizar sêmen canino. Estes resultados

concordam parcialmente com os achados de STRÖM *et al.* (1997), FARSTAD (1998), HAY *et al.* (1997), PEÑA *et al.* (1998), pois estes autores preconizam 2 horas de equilíbrio a temperatura de 4 ou 5 °C. Sugere-se que novos estudos sejam efetuados com o intuito de se dirimir as dúvidas pendentes, máxime nas características aqui pesquisadas.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A crioproteção do glicerol, na concentração de 8%, associação ao diluente a base de Tris-gema preservou as características morfofisiológicas do espermatozoide canino no processo de congelação;
- Uma hora é suficiente para estabilizar as células espermáticas com os componentes do diluente à temperatura de 4 °C.

Referencias

- FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n.42, p.251-260, 1996.
- FARSTAD, W. **Cryopreservation of canine semen**. (1998). Disponível em: <http://www.lpsi.barc.usda.gov/scripts/odbic.exe/embryomail/subj_message.tpl>. Acesso em: 08 mar. 2002.
- HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, New York, v.48, p.1329-1342, 1997.

KRAUSE, D. **Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde.** Hannover, 1966. 165 p. Tese (Livre Docência) - Tierärztliche Hochschule.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial.** 6. ed. Porto Alegre: Sulina 1987. v.2, p.651-2.

OETTLE, E.E.; SOLEY, J.T. Anomaliás de los espermatozoides en el perro: estudio **Noticias Médico Veterinarias de imágenes obtenidas al microscopio óptico y electrónico**, v.59, p.28-70, 1988.

OLIVEIRA, J.V.L.; BARRETO, C.S.; FILHO, A.I.R. Avaliação de sêmen canino pós-descongelação utilizando-se tris-gema e lactose-gema em quatro diferente período de equilíbrio. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.23, n.3, páginas, 1999.

PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. **Theriogenology**, New York, v.50, p.163-174, 1998.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Quality of canine sêmen submitted to single or fractionated glycerol addition during the greezing process. **Theriogenology**, New York, v.59, p.821-829, 2003.

STRÖM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, New York, v.48, p.247-256, 1997.

WEISS, R.R.; RODASKI, S.; SANTOS, I.W.; ALMEIDA, L.M.; BÜCHELE, J.M. Estudo preliminar de algumas características do semen canino. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.5, p.76-71, 2000.

Recebido: 30/06/2003

Aprovado: 23/10/2003