

## CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO COM UM DILUIDOR À BASE DE ÁGUA DE COCO

### CRYOPRESERVATION OF CANINE SEMEN USING A COCONUT WATER EXTENDER

Rita de Cássia Soares Cardoso<sup>1</sup> Alexandre Rodrigues Silva<sup>2</sup> Daniel Couto Uchoa<sup>3</sup>  
Lúcia Daniel Machado da Silva<sup>4</sup>

#### RESUMO

A estocagem do sêmen por um longo período, permitindo o seu posterior uso representa uma importante ferramenta para criadores que desejam resguardar o potencial genético de seus reprodutores. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da água de coco, gema de ovo e glicerol sobre o resfriamento e a criopreservação de sêmen canino. A fração espermática do ejaculado de 12 cães foi avaliada macro e microscopicamente e, em seguida, dividida em quatro alíquotas, submetidas à congelação em quatro diluidores, sendo todos à base água de coco e diferindo quanto à presença ou não da gema de ovo e glicerol. Durante o resfriamento, não se observou diferença entre os grupos, entretanto, após o congelamento e descongelamento, o diluidor adicionado de gema de ovo e glicerol (ACGG) foi superior aos demais quanto à motilidade, vigor e morfologia espermática. Nesse grupo, os valores de motilidade (%), vigor (0-5) e alterações morfológicas totais (%) após a descongelação foram  $56,7 \pm 16,1$ ,  $3,4 \pm 0,5$  e  $23,8 \pm 8,4$ , respectivamente. Diante dos resultados, concluiu-se que a adição de gema de ovo e glicerol ao diluidor foi necessária para a preservação da qualidade espermática após criopreservação de sêmen canino.

**Palavras-chave:** sêmen, cão, água de coco, glicerol, gema de ovo, espermatozóide.

#### SUMMARY

The long-term storage of frozen semen represents a tool for breeders that want to preserve the genetic potential of their sires. The aim of this experiment was to evaluate the effect of coconut water, egg yolk and glycerol on canine semen cooling and freezing. The sperm rich fraction of 12 dogs was submitted to

macroscopic and microscopic evaluation. This fraction was divided into four aliquots and frozen with coconut water extender regarding the presence of egg yolk and glycerol. After cooling, there was no difference among groups. However, after thawing, coconut water plus egg yolk and glycerol (ACGG) was superior than others concerning to sperm motility, vigor and morphological abnormalities. In this group, motility (%), vigor (0-5) and abnormalities (%) were  $56.7 \pm 16.1$ ,  $3.4 \pm 0.5$  e  $23.8 \pm 8.4$ , respectively. In conclusion, it is necessary to add egg yolk and glycerol to the coconut water extender to improve the cryopreservation of canine semen.

**Key words:** semen, dog, coconut water, glycerol, egg yolk, spermatozoa.

#### INTRODUÇÃO

Ao se desenvolverem técnicas para criopreservação de sêmen, o objetivo principal é minimizar os danos causados aos espermatozoides durante o congelamento e descongelamento e, assim, recuperar um maior número possível de células viáveis. Um dos fatores que contribui para o sucesso da criopreservação é o diluidor utilizado. Um bom diluidor caracteriza-se pela ausência de toxicidade à célula espermática; pela isotonicidade, poder nutritivo e tampão eficaz; pela ação estabilizadora de membrana; pelo potencial hidrogeniônico (pH) que favorece a sobrevivência espermática e, por último, por ser de fácil preparo e baixo custo (MIES FILHO,

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Mestre em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade do Estado do Ceará (UECE). Rua: Major Weyne 662, Jardim América, 60415-730, Fortaleza, CE. E-mail: ritascardoso@bol.com.br/rccard@zipmail.com.br. Autor para correspondência.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, Mestre em Ciências Veterinárias, FAVET, UECE.

<sup>3</sup>Estudante do Curso de Medicina Veterinária, FAVET, UECE.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, Doutor em Ciências Veterinárias, Professor FAVET, UECE.

1987; CONCANNON & BATTISTA, 1989). O diluidor deve caracterizar-se dessa maneira antes da adição de protetores de resfriamento e /ou crioprotetores.

Diversos diluidores já foram utilizados para a congelação de sêmen canino (FOOTE, 1964; ANDERSEN, 1975; SILVA & VERSTEGEN, 1995). No entanto, nem todos possuem todos os pré-requisitos para serem considerados um bom diluidor. Recentemente, foi utilizado com sucesso um diluidor à base de água de coco para a congelação de sêmen canino (CARDOSO *et al.*, 2000). Tal diluidor, além de preservar a qualidade espermática, ainda apresenta um baixo custo e fácil preparo. Estes autores encontraram melhores resultados de motilidade e vigor espermático utilizando o diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol do que quando não adicionando estas substâncias. No entanto, ainda não foi estudado o efeito da adição de gema de ovo e do glicerol separadamente.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito protetor da gema de ovo contra o choque térmico do sêmen canino submetido ao resfriamento em diluir à base de água de coco, bem como o efeito da gema de ovo, do glicerol ou da associação de ambos sobre a viabilidade do sêmen canino congelado com este mesmo diluidor.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 cães, sendo 5 Pastores Alemães, 2 Boxers, 2 American Staffordshire Terriers, 2 Rottweilers e 1 Samoieda, com idade entre 18 meses e 6 anos, pertencentes ao canil da Polícia Militar do Ceará e a canis particulares. Os animais foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial e receberam água à vontade. Foi coletado um ejaculado de cada animal através da técnica de manipulação digital, separado nas suas três frações (CHRISTIANSEN, 1988). A fração rica em espermatozoides foi retida para avaliação e congelação. Na avaliação macroscópica, considerou-se o volume, o aspecto, cor e viscosidade. Na avaliação microscópica, os parâmetros mensurados foram: motilidade (percentagem de espermatozoides móveis com movimento retilíneo progressivo), vigor espermático, mensurado em uma escala de 0 (sem movimento) a 5 (movimento vigoroso, retilíneo e progressivo; CBRA, 1998) e a morfologia espermática. A análise da motilidade e do vigor foi realizada com auxílio da microscopia óptica (100x). Para a avaliação da morfologia espermática, foi realizado um esfregaço de sêmen, o qual foi corado em uma solução que continha água destilada e

Giemsa na proporção de 1ml:100µl. As lâminas foram imersas nessa solução por 15 minutos, sendo depois lavadas em água corrente e secadas (CARDOSO *et al.*, 2000). Essa avaliação também foi realizada com o emprego de um microscópio óptico, porém, a um aumento de 1000x, fazendo-se a contagem de 200 células por esfregaço. As alterações morfológicas foram classificadas em primárias e secundárias (SEAGER, 1969).

Utilizaram-se apenas os ejaculados considerados de excelente qualidade, onde os mesmos apresentaram aspecto normal, cor branca opalescente e viscosidade leitosa e com parâmetros macro e microscópicos (Tabela 1) dentro da normalidade para a espécie canina (CHRISTIANSEN, 1988).

Após a avaliação, cada ejaculado foi dividido em quatro alíquotas, uma para cada diluidor a ser testado. O primeiro diluidor foi denominado de AC, sendo composto por 50% de água de coco, 25% de água destilada e 25% de citrato de água destilada e 25% de citrato de sódio a 5%. O segundo, ACG, era composto pelo diluidor AC acrescido de 20% de gema de ovo. O terceiro foi denominado de ACGL e consistiu no diluidor AC adicionado de 6% de glicerol. E, por último, o quarto diluidor (ACGG) era constituído pelo diluidor AC acrescido de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol. Os diluidores antes do acréscimo de gema de ovo e de glicerol, tiveram a osmolaridade ajustada entre 300-310 mmoℓ/kg, através da adição de água destilada ou água de coco pois a osmolaridade do sêmen do cão situa-se nessa faixa (BATT, 1992). Os diluidores AC e ACG foram adicionados ao sêmen de uma só vez logo após a avaliação inicial, com ambos a 37°C, na proporção de 1:1. Os diluentes ACGL e ACGG foram divididos em duas partes iguais (a e b). A diluição inicial foi feita com a porção “a” que não continha glicerol e foi adicionada ao sêmen a uma temperatura de 37°C, na proporção de 2:1. Após o resfriamento do sêmen diluído com os quatro diluidores em banho-maria por aproximadamente 40 minutos, estes atingiam

Tabela 1 - Características do sêmen fresco coletado dos cães utilizados no experimento.

| Parâmetros                         | Média ± desvio padrão |
|------------------------------------|-----------------------|
| Volume da fração espermática (mℓ)  | 1,4 ± 0,8             |
| Motilidade (%)                     | 96,7 ± 3,3            |
| Vigor (0-5)                        | 4,9 ± 0,2             |
| Alterações morfológicas totais (%) | 12,7 ± 5,8            |
| Alterações secundárias             | 0,5 ± 0,8             |
| Alterações primárias               | 12,2 ± 6,0            |

entre 12 -15°C. Após este período, o sêmen diluído foi transferido para um refrigerador até atingir uma temperatura de 4°C. Quando esta temperatura foi atingida, a parte “b”, acrescida de 12% de glicerol, foi incorporada ao sêmen, a 4°C, obtendo-se uma concentração final de glicerol de 6%. Esta segunda diluição, na qual se utilizaram partes iguais do diluidor (parte b), foi realizada em três etapas com intervalos de cinco minutos. Em todos os grupos, a diluição foi realizada na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor).

Em seguida, o sêmen foi envazado em palhetas de 0,25mℓ fechadas com álcool polivinílico. As palhetas, dispostas horizontalmente, foram expostas aos vapores de nitrogênio por cinco minutos a uma altura de 5cm do nível de nitrogênio líquido e, posteriormente, acondicionadas em botijão criobiológico (-196°C). Foram processadas avaliações quanto à motilidade e vigor espermáticos após a primeira diluição, resfriamento e segunda diluição. Após uma semana, foi realizada a descongelação em banho-maria a 37°C, procedendo-se novas análises de motilidade, vigor e morfologia espermática.

Os dados quantitativos (volume da fração espermática, motilidade, vigor e alterações morfológicas) foram expressos na forma de média e desvio padrão. A motilidade e o percentual de alterações morfológicas foram comparados entre os quatro grupos, bem como entre o sêmen fresco e cada grupo através do teste t de Student. O vigor foi comparado da mesma forma, porém, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Em todos os testes, os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . O número de repetições foi de 12 para cada tratamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das avaliações realizadas durante as etapas do processo de congelação e após a descongelação estão sumarizados na tabela 2. Não foi evidenciada diferença significativa nos parâmetros motilidade e vigor ( $p > 0,05$ ) entre os quatro grupos até a etapa de adição de glicerol. Nessa etapa, só foi realizada comparação entre os diluidores ACGI e ACGG, visto que somente estes diluidores apresentavam glicerol, não sendo observadas diferenças ( $p > 0,05$ ).

Até a etapa de adição de glicerol, o sêmen apresentou boa qualidade em todos os grupos, com motilidade variando de 70,9 a 72,3%. Para o resfriamento ou mesmo criopreservação de sêmen, faz-se necessário a adição de protetores de

resfriamento como a gema de ovo, leite e proteínas do leite. Segundo SILVA (1999), tais substâncias protegem contra o choque térmico e, no caso da gema de ovo, ela parece agir na superfície da membrana plasmática, aparentemente induzindo uma alteração não permanente na composição da membrana, prevenindo uma ruptura da mesma. Entretanto, neste experimento, a solução à base de água de coco sozinha ou adicionada de 20% de gema de ovo mostrou-se igualmente eficaz na proteção contra o choque térmico durante o resfriamento. PEREIRA *et al.* (1999) também obtiveram bons resultados com a solução à base de água de coco sem a adição de outras substâncias no resfriamento do sêmen canino por até seis horas.

Após a descongelação, os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou a diluição com ACGG. Além disso, esse grupo diferiu significativamente dos demais quanto a motilidade e vigor espermático. A motilidade pós-descongelação obtida nesse grupo ( $56,7 \pm 16,1\%$ ) está na faixa ideal (50-65%) para realização de inseminação artificial com sêmen congelado segundo CONCANNON & BATTISTA (1989). CARDOSO *et al.* (2000) obtiveram 50% de espermatozóides móveis e um vigor 3,0 após a descongelação utilizando o diluidor à base de água de coco acrescido de 20% de gema de ovo e 4% de glicerol. Os melhores resultados com ACGG foram provavelmente devido a uma associação dos efeitos crioprotetores da gema de ovo e glicerol. Apesar de o espermatozóide canino ser considerado relativamente resistente às criorjúrias, OLAR (1984) observou que a congelação de sêmen canino na ausência de um crioprotetor, assim como em outras espécies, resulta em uma alta redução no número de espermatozóides móveis após a descongelação. Esse efeito protetor do glicerol deve-se ao fato do mesmo transpor a membrana celular, permitindo a desidratação da célula através da saída de água por osmose (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990), evitando a formação de cristais de gelo que poderão promover a ruptura da membrana plasmática do espermatozóide. Provavelmente, o glicerol teve uma maior participação na atividade crioprotetora, visto que o grupo onde diluidor à base de água de coco foi adicionado de gema de ovo (ACG) não foi capaz de preservar a qualidade espermática.

No tocante às alterações morfológicas, o diluidor ACGG foi superior aos demais, apresentando um menor percentual de alterações totais e secundárias (Tabela 3). Tais alterações podem ter sido ocasionadas pelas diversas mudanças térmicas às quais o espermatozóide é submetido (FARSTARD, 1996).

Tabela 2 - Características do sêmen após a primeira diluição, resfriamento, glicerolização e descongelamento nos quatro diluidores utilizados (AC; ACG; ACGL e ACGG).

|                   |                | AC                       | ACG                      | ACGL                     | ACGG                     |
|-------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Primeira diluição | Motilidade (%) | 95,8 ± 4,1 <sup>a</sup>  |
|                   | Vigor (0-5)    | 4,8 ± 0,4 <sup>a</sup>   |
| Resfriamento      | Motilidade (%) | 85,0 ± 12,0 <sup>a</sup> | 86,7 ± 11,1 <sup>a</sup> | 84,6 ± 11,8 <sup>a</sup> | 86,7 ± 11,1 <sup>a</sup> |
|                   | Vigor (0-5)    | 4,1 ± 0,7 <sup>a</sup>   | 3,8 ± 0,7 <sup>a</sup>   | 4,0 ± 0,6 <sup>a</sup>   | 3,8 ± 0,7 <sup>a</sup>   |
| Segunda diluição  | Motilidade (%) | -                        | -                        | 70,9 ± 24,6              | 72,3 ± 24                |
|                   | Vigor (0-5)    | -                        | -                        | 3,6 ± 0,8                | 3,6 ± 0,8                |
| Descongelamento   | Motilidade (%) | 2,1 ± 3,3 <sup>c</sup>   | 2,1 ± 5,8 <sup>c</sup>   | 22,5 ± 9,4 <sup>b</sup>  | 56,7 ± 16,1 <sup>a</sup> |
|                   | Vigor (0-5)    | 0,4 ± 0,6 <sup>c</sup>   | 0,5 ± 1,1 <sup>bc</sup>  | 2,6 ± 1,0 <sup>b</sup>   | 3,4 ± 0,5 <sup>a</sup>   |

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma linha implicam diferença significativa (p<0,05)

AC- 50% de água de coco + 25% de água destilada + 25% de citrato de sódio a 5%; ACG- diluidor AC + 20% de gema de ovo; ACGL- diluidor AC + 6 % de glicerol; ACGG- diluidor AC + 20% de gema de ovo + 6 % de glicerol.

Diante dos resultados, pode-se concluir que água de coco e a gema de ovo conferem proteção contra o choque térmico durante o resfriamento de sêmen canino. Além disso, a adição de gema de ovo e glicerol ao diluidor à base de água de coco é necessária para a preservação da qualidade espermática após a descongelamento, podendo tal diluidor ser recomendado para a criopreservação de sêmen canino.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Domingos B. de Oliveira pela assistência técnica e aos Doutores José Ferreira Nunes e Ricardo Tonioli pelas sugestões dadas na escrita do trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, K. Insemination with frozen semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*, v.10, n.1, p.1-4, 1975.
- BATT, P. Canine semen. In: Artificial insemination in dogs. *Proceedings*. Sydney : Post graduate Committee, 1992. mp.4.
- CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., UCHOA, D.C., *et al.* Congelamento do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. *Ciência Animal*, Fortaleza, v.10, p.29-36, 2000.
- CBRA- *Manual para exame andrológico. Avaliação de sêmen animal*. 2. ed. S.l. : s.e., 1998. p.12.
- CHRISTIANSEN, I.J. *Reprodução no cão e no gato*. São Paulo : Manole, 1988. 363p.
- CONCANNON P.W., BATTISTA M. Canine semen freezing

Tabela 3 - Percentual de alterações morfológicas totais, primárias e secundárias no sêmen fresco após a descongelamento nos quatro diluidores utilizados (AC; ACG; ACGL e ACGG).

|                            | Sêmen a fresco          | AC                       | ACG                    | ACGL                     | ACGG                    |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Alterações totais (%)      | 12,7 ± 5,8 <sup>c</sup> | 49,5 ± 20,7 <sup>b</sup> | 48 ± 21,3 <sup>b</sup> | 47,5 ± 18,2 <sup>b</sup> | 23,8 ± 8,4 <sup>a</sup> |
| Alterações primárias (%)   | 0,5 ± 0,8 <sup>a</sup>  | 0,5 ± 0,6 <sup>a</sup>   | 0,5 ± 0,6 <sup>a</sup> | 0,3 ± 0,4 <sup>a</sup>   | 0,3 ± 0,5 <sup>a</sup>  |
| Alterações secundárias (%) | 12,2 ± 6,0 <sup>c</sup> | 49,0 ± 20,8 <sup>b</sup> | 47,5 ± 21 <sup>b</sup> | 47,1 ± 18,2 <sup>b</sup> | 23,4 ± 8,3 <sup>a</sup> |

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma linha implicam diferença significativa (p<0,05).

AC- 50% de água de coco + 25% de água destilada + 25% de citrato de sódio a 5%; ACG- diluidor AC + 20% de gema de ovo; ACGL- diluidor AC + 6 % de glicerol; ACGG- diluidor AC + 20% de gema de ovo + 6 % de glicerol.

and artificial insemination. In: KIRK, R.W. *Current veterinary therapy- Small animal practice*, X. Philadelphia: Saunders, 1989. p.1247-1289.

FARSTARD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.251-260, 1996.

FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. *American Journal of Veterinary Research*, v.25, n.104, p.37-40, 1964.

HAMMERSTEDT, R., GRAHAM, J., NOLAN, J. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v.11, p.73-88, 1990.

MIES FILHO, A. *Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial*. Porto Alegre : Sulina, 1987. Tecnologia do sêmen-I.II- Diluição, conservação e transporte de sêmen : p.419, 470, 479-480.

OLAR, T.T. *Cryopreservation of dog semen*. Colorado, 1984. Tese (Doutorado) - Colorado State University, 1984.

PEREIRA, B.S., UCHOA, D.C., AQUINO, C.A. *et al.* O efeito do uso de diluentes à base de água de coco no resfriamento do sêmen canino a 4°C. In: SIMPÓSIO CEARENSE DE CIÊNCIA ANIMAL, 1999, Fortaleza, CE. *Anais...* Fortaleza: Sociedade Cearense de Ciência Animal, 1, 1999. v.1. p.94.

- SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. **A I Digest**, v.17. p.6-7, 1969.
- SILVA, L.D.M. Tecnologia do sêmen canino. In: SIMPÓSIO CEARENSE DE CIÊNCIA ANIMAL, 1, 1999, Fortaleza, Ce. **Anais...** Fortaleza : Sociedade Cearense de Ciência Animal, 1999. v.1. p.43-49.
- SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.571-579, 1995.