

# Viabilidade do sêmen canino submetido a criopreservação com glicerol e etileno-glicol

## Viability of canine semen submitted by cryopreservation with glycerol and ethylene-glycol

Ana Cristina Nery de Castro,\* Aline Pacheco,\* Daniele Barbosa da Silva,\* Débora Silva Gondim,\* Tânia Góes de Pinho\*\*

### Resumo

Com o objetivo de comparar a eficiência dos crioprotetores glicerol e etileno-glicol na criopreservação do sêmen canino, 15 ejaculados foram avaliados quanto à motilidade progressiva, vigor, porcentagem de espermatozoides vivos e de membranas plasmáticas íntegras, imediatamente após a colheita e após a criopreservação. Após a colheita e avaliação (GI), as amostras foram divididas em duas frações, centrifugadas e ressuspensas em diluidor tris-gema acrescido de 6% de glicerol (GII) e tris-gema acrescido de 6% de etileno-glicol (GIII) a 37°C. Após a diluição e envase em palhetas de 0,5 mL, o sêmen foi refrigerado a 5°C por 60 minutos e a seguir colocado por 20 minutos no vapor do nitrogênio líquido para o congelamento e posteriormente armazenado em botijão criobiológico. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos. As motilidades progressivas observadas nos grupos GI, GII e GIII foram respectivamente de 85,67±06,78%, 46,53±20,69% e 47,67±20,52% e o vigor de 4,47±0,74, 2,60±0,63 e 2,73±0,80. O percentual de espermatozoides vivos obtido foi de 83,60±07,88%, 48,20±14,85% e 46,87±16,61% e o percentual de membranas íntegras de 71,73±15,07%, 44,45±09,18% e 41,73±13,33%, respectivamente para os grupos GI, GII e GIII. Não houve diferença significativa nas características seminais ( $P > 0,05$ ) das amostras criopreservadas com glicerol e etileno-glicol. Verifica-se ainda que houve queda em todos os parâmetros do sêmen após a criopreservação, apesar de não torná-lo inviável. Conclui-se então que, tanto o glicerol quanto o etileno-glicol, podem ser utilizados na criopreservação do sêmen canino.

*Palavras-chave:* sêmen, crioprotetor, cão.

### Abstract

In the aim to compare the efficiency of glycerol and ethylene-glycol cryoprotectors in dog semen's cryopreservation, 15 ejaculate were analyzed a for progressive motility, vigor, live spermatozoon's percentage and complete membranes, immediately after collection (GI) and after cryopreservation in diluents added glycerol (GII) and ethylene-glycol (GIII). After the collection and GI analyze, the samples were divided in two parts, that were centrifuged and added, to the precipitate, the diluents tris-yolk plus 6% of glycerol (GII) and 6% ethylene-glycol (GIII) 37°C. After the dilution, the samples were loaded in straws of 0.5 mL, submitted to 5°C refrigeration by 60 minutes, and after to vapor of nitrogen for about 20 minutes. Then they were submersed and stored in liquid nitrogen. The semen was thawed in water bath 37°C during 30 seconds. After evaluation the results obtained in this study were: progressive motility 85.67±6.78%, 46.53±20.69% and 47.67±20.52%, as well as vigor of 4.47±0.74, 2.60±0.63 and 2.73±0.80, live spermatozoon's percentage of 83.60±7.88%, 48.20±14.85% and 46.87±16.61% and complete membranes of 71.73±15.07%, 44.45±9.18% and 41.73±13.33%, respectively to the groups GI, GII and GIII. It was observed that there were no difference between seminal characteristics ( $P > 0.05$ ) in the samples cryopreserved with glycerol and ethylene-glycol. Although there was a common drop in all semen parameters after the cryopreservation, the semen quality was even viable. It was concluded that both glycerol and ethylene-glycol, can be used in the cryopreservation of dog's semen.

*Keywords:* semen, cryopreservation, dog.

### Introdução

Em caninos, a inseminação artificial com sêmen congelado apresenta resultados modestos, o que impede a sua maior aplicabilidade. A técnica de criopreservação do sêmen canino é uma das limitações observadas. Durante o processo de resfriamento e congelação do sêmen, as células espermáticas sofrem danos causados pela formação de microcristais

de gelo intracelular e extracelular, pela desidratação intracelular e toxicidade do crioprotetor, levando a alterações na permeabilidade da membrana celular e perda da viabilidade espermática (Watson, 2000). Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de se obter um meio diluidor que exerça maior proteção à célula espermática durante os processos de congelação e descongelação. O crioprotetor intracelular mais utilizado na congelação de sêmen de cães

\*Alunos do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – FV/UFF.

\*\*Professora do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da FV/UFF.

domésticos é o glicerol (Cunha e Lopes, 1999). Entretanto, sabe-se que ele também representa um fator de toxicidade ao espermatozóide (Farstad, 1996). A busca de alternativas para melhorar a viabilidade espermática justifica a avaliação de outros crioprotetores, como por exemplo, o etileno-glicol. Este tem sido utilizado como substância crioprotetora em diversos protocolos de preservação de sêmen ovino (Moraes et al., 1998), eqüino (Neves Neto et al., 1995) e cão (Santos et al., 2001; Cavalcanti et al., 2002; Satzinger, 2002).

Os testes de avaliação espermática são preconizados para verificar os danos sofridos pelos espermatozoides, bem como prever a capacidade fecundante do sêmen após a criopreservação. A determinação da motilidade progressiva, vigor espermático, da porcentagem de espermatozoides vivos e da integridade de membrana plasmática, pode ser realizada através de testes relativamente de simples execução, e que fornecem informações importantes sobre o movimento e a viabilidade espermática após a criopreservação. O choque térmico que ocorre durante o processo de criopreservação promove mudanças celulares irreversíveis levando à perda rápida de motilidade, sendo substituída por movimento anormal do espermatozóide (principalmente em círculos), danos à integridade do acrossoma, da membrana plasmática e redução do metabolismo, dentre outros (Graham, 1996). Os testes de motilidade progressiva e vigor avaliam respectivamente intensidade e qualidade de movimento espermático e os testes de viabilidade espermática e o hiposmótico avaliam a integridade e atividade da membrana plasmática espermática, características importantes nos eventos que precedem a fertilização (Jeyendran et al., 1984).

O objetivo deste estudo foi comparar a qualidade do sêmen canino após a criopreservação com glicerol e etileno-glicol, avaliando-se a motilidade progressiva, vigor espermático, porcentagem de espermatozoides vivos e porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra.

## Material e métodos

Foram utilizados 15 ejaculados previamente selecionados (e"70% de motilidade progressiva e d"20% patologia espermática) de seis cães hípidos. As amostras foram avaliadas imediatamente após a colheita (GI) e após a criopreservação nos meios acrescidos de glicerol (GII) e etileno-glicol (GIII).

Foram avaliados a motilidade progressiva (0-100%), o vigor espermático (0-5), a porcentagem de espermatozoides vivos, utilizando-se o corante eosina e a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, determinada pelo teste hiposmótico (HO). Realizou-se o HO através da preparação de duas amostras de sêmen, uma em solução hiposmótica (150mosmol/L) e outra em solução isosmótica (300mosmol/L), incubadas por 30 minutos em banho-maria a 37°C (Inamassu et al. 1999, Souza 2001) e avaliadas segundo a classificação de Jeyendran et al. (1984).

O ejaculado colhido por manipulação digital foi avaliado quanto às características seminais mencionadas e então dividido em duas frações para centrifugação (300g/10 minutos) e posterior diluição em dois meios distintos: tris-gema acrescido de 6% de glicerol e tris-gema acrescido de 6% de etileno-glicol, a 37°C. O volume do diluidor a ser adicionado foi calculado com base no volume e concentração da dose inseminante (palheta de 0,5 mL e 40 X 10<sup>6</sup> espermatozoides /mL, respectivamente), motilidade progressiva, volume e concentração do ejaculado

As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, sendo em seguida submetidas à refrigeração (5°C/60 minutos). Após foram congeladas em bandejas no vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos e depois submersas e armazenadas em nitrogênio líquido.

As amostras foram descongeladas (banho-maria 37°C/30 segundos) e imediatamente avaliadas quanto às características seminais citadas.

Para a avaliação dos resultados de cada parâmetro foram realizadas as provas não paramétricas de análise de variância (Teste de ANOVA) e o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre as variáveis, motilidade progressiva, vigor espermático, porcentagem de espermatozoides vivos e porcentagem de membranas íntegras, em cada grupo estudado. As estatísticas calculadas foram consideradas significativas quando P < 0,05.

## Resultados e discussão

Os resultados da criopreservação seminal obtidos neste estudo são apresentados na Tabela 1 e demonstram que ocorre uma queda significativa (P<0,05), em todos os parâmetros seminais avaliados após o congelamento do sêmen. Fatores como choque térmico e alterações da membrana plasmática do espermatozóide podem ser a razão para o decréscimo da qualidade do sêmen submetido à criopreservação. Não houve diferença (P>0,05) entre a motilidade progressiva e o vigor espermático nos grupos GII e GIII, confirmando os resultados de Santos et al. (2001), que também verificaram a eficiência do etileno-glicol e glicerol na criopreservação do sêmen de cães. Porém discorda de Cavalcanti et al. (2002) que verificaram melhor viabilidade espermática utilizando glicerol a 7%. A porcentagem de espermatozoides vivos e de membranas íntegras nos ejaculados criopreservados nos dois grupos não apresentaram diferenças (P>0,05).

**Tabela 1:** Características do sêmen canino avaliado a fresco (GI) e após a criopreservação (GII e GIII) (média ± desvio-padrão).

GRUPOS	Motilidade Progressiva (%)	Vigor Espermático (0-5)	Espermatozoides Vivos (%)	Membranas Íntegras (%)
GI	85,67 ± 06,78 <sup>a</sup>	4,47 ± 0,74 <sup>a</sup>	83,60 ± 07,88 <sup>a</sup>	71,73 ± 15,07 <sup>a</sup>
GII	46,53 ± 20,69 <sup>b</sup>	2,60 ± 0,63 <sup>b</sup>	48,20 ± 14,85 <sup>b</sup>	44,45 ± 09,18 <sup>b</sup>
GIII	47,67 ± 20,52 <sup>b</sup>	2,73 ± 0,80 <sup>b</sup>	46,87 ± 16,61 <sup>b</sup>	41,73 ± 13,33 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si (P < 0,05)

Verificou-se ainda neste estudo uma correlação positiva entre todos os parâmetros avaliados no sêmen a fresco e no congelado. A correlação elevada foi verificada entre a motilidade progressiva e a porcentagem de espermatozóides com membranas plasmáticas íntegras para o sêmen a fresco ( $r = 0,86$ ) e congelado com glicerol ( $r = 0,80$ ) e entre motilidade progressiva e porcentagem de espermatozóides vivos ( $r = 0,83$ ) no sêmen criopreservado em etileno-glicol. Resultados semelhantes foram observados por Jeyendran et al. (1984) e

Souza et al. (2001) no sêmen a fresco. Porém, isto não justifica a realização de apenas um ou dois testes na avaliação da qualidade do sêmen congelado, pois maior precisão é obtida em testes associados.

### Conclusão

Os resultados deste trabalho sugerem que tanto o glicerol quanto o etileno-glicol, podem ser utilizados na criopreservação do sêmen canino.

### Referências

CAVALCANTI, M. C. O.; MOURA, C. S.; GUERRA, M. M. P.; SILVA, S. V. Ação crioprotetora do glicerol e etileno-glicol no congelamento do sêmen de cão. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 26, n. 3, p. 174-176, 2002.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D. Efeitos da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 23, n. 3, p. 306-308, 1999.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 42, p. 251-260, 1996.

INAMASSU, A.; UECHI, E., LOPES, M. D. 1999. Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v. 23, n. 3, p. 302-304.

JEYENDRAN, R. S.; VANDER VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. Development of no assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, v. 70, p. 219-228, 1984.

MORAES, C. N.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C.; SCHWEITZER, C. M. Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etileno-glicol. *Ciê. Rural*, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1998.

NEVES NETO, J. R.; MERCANTE, C. F. J.; ARRUDA, R. P. Fertilidade do sêmen eqüino congelado em etileno-glicol ou glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. *Anais...*Belo Horizonte: CBRA, 1995, p. 292.

SANTOS, S. E. C.; VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; VISINTIN, J. A. Comparação de dois crioprotetores na congelação de sêmen de cães. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 25, n. 3, p. 472-473, 2001.

SATZINGER, S. *Acompanhamento do proestro e estro em fêmeas da raça Dogue Alemão e comparação de 2 técnicas de inseminação artificial com sêmen congelado utilizando o etileno-glicol com crioprotetor.* 2002. 70 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo., 2002.

SOUZA, F. F.; LOPES, M. D.; BARRETO, S. Avaliação da integridade estrutural e funcional da membrana de espermatozóides de cães utilizando o teste hiposmótico e a coloração com sonda fluorescente. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 25, n. 3, p. 462-464, 2001.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fert. Dev.*, v. 7, p. 871-891, 1995.