

Padronização de uma técnica de congelamento de sêmen em cães

Standartization of a technique for canine semen freezing

Mariana Machado Neves¹, Marc Henry¹,
Carlos Augusto Alanis Clemente¹ & Luiz Guilherme Dias Heneine²

RESUMO

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de melhorar a técnica da criopreservação de sêmen em cães. O objetivo deste trabalho foi estabelecer o meio diluidor de congelamento do sêmen canino mais adequado para um protocolo de congelamento realizado em máquina computadorizada, além de otimizar a temperatura de descongelamento. Foram usados cinco cães e coletados três ejaculados/animal. Foram testados os meios Tris-cítrico (G1), Lactose-gema (G2) e INRA 82 (G3) com 5% de glicerol. Alíquotas de sêmen foram diluídas em cada meio e foram congeladas em máquina computadorizada programada para realizar uma curva de resfriamento de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, de $25-29^{\circ}\text{C}$ até 5°C , período de equilíbrio de 1h a 5°C , seguida da curva de congelamento de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, de 5°C até -120°C . Foram testadas duas temperaturas de descongelamento: A) $37^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ e B) $52^{\circ}\text{C}/10\text{s}$, seguida de $37^{\circ}\text{C}/30\text{s}$. Os espermatozoides foram avaliados quanto à motilidade progressiva, morfologia, reatividade ao teste hiposmótico e integridade de membranas avaliadas pelo uso de fluorescência (CFDA/IP). Os meios de congelamento Tris-cítrico e Lactose-gema foram superiores ao meio INRA quanto aos parâmetros de motilidade e morfologia espermática ($p < 0,05$). Não houve diferença entre eles quanto à manutenção da integridade funcional e estrutural das membranas espermáticas ($p > 0,05$). O descongelamento a 52°C resultou no aparecimento de maior porcentagem de anormalidades acrossomais que o descongelamento a 37°C ($p < 0,05$). Com base nos resultados, pode-se concluir que os meios Tris-cítrico e Lactose-gema preservaram melhor a viabilidade espermática após o descongelamento a $37^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ na curva de resfriamento de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e de congelamento de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Descritores: sêmen canino, congelamento, meio diluidor, temperatura de descongelamento.

ABSTRACT

Many researches have been developed to improve the canine semen cryopreservation technique. The aims of the present work were to determine the freezing extenders adequacy to freeze canine semen using a computerized system. Two thaw temperature was evaluated as well. Five dogs were used and three ejaculates/animal were collected. The extenders tested were Tris-citric-yolk (G1), lactose-yolk (G2) and INRA 82 (G3), with 5% glycerol. A computerized freezing system was used and cooling rate was $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, from $25-29^{\circ}\text{C}$ to 5°C , the equilibration period was at $5^{\circ}\text{C}/1\text{h}$ followed by freezing the samples at a rate of $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, from 5°C to -120°C . Thawing temperatures were: A) $37^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ and B) $52^{\circ}\text{C}/10\text{s}$ followed by $37^{\circ}\text{C}/30\text{s}$. Evaluation post thaw attributes were spermatic motility and morphology, HOST and sperm membrane integrity by a fluorescence test using CFDA/PI. Motility and sperm morphology were better preserved with the extenders Tris-citric yolk and lactose-yolk than with INRA 82 ($p < 0.05$). No difference was observed among treatments as for CFDA/PI and HOST ($p > 0.05$) evaluations. Thawed temperature of 52°C provoked more acrosome abnormality than when 37°C was used ($p < 0.05$). In conclusions, Tris-citric and Lactose-yolk were more efficient than INRA 82 to preserve the spermatozoa viability post-thaw and thawing at $37^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ showed to be more suitable when the cooling and freezing curve were $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, respectively.

Keywords: canine semen, freezing extender, thawed temperature.

INTRODUÇÃO

O sucesso da técnica de congelamento é expresso pela viabilidade espermática após o descongelamento e depende de fatores inerentes aos animais, como as diferenças entre raças e indivíduos, ligadas à qualidade seminal e resistência espermática a baixas temperaturas e à definição das etapas utilizadas durante o processo de criopreservação e descongelamento [6]. Neste aspecto, para a padronização de uma curva de resfriamento e de congelamento, é necessário eliminar os efeitos do local onde elas são executadas, do meio diluidor usado e da temperatura de descongelamento [8,11,23].

A literatura cita o uso de caixa de isopor com gelo, geladeira e até freezer a -152°C para promover ambientes de baixa temperatura durante a criopreservação [1,2,4]. São poucos os trabalhos com sêmen canino que utilizam máquina computadorizada capaz de realizar as curvas de resfriamento e de congelamento. A vantagem deste aparelho é a garantia da obtenção de curvas com queda homogênea e gradual da temperatura até -120°C , além de permitir a programação da velocidade desejada [5].

Dentre os meios diluidores existentes, o Tris-cítrico-gema é o meio padrão para o congelamento do sêmen canino, sendo que o meio lactose-gema vem apresentando resultados satisfatórios pós-descongelamento, provavelmente devido ao seu efeito osmótico adicional [12,13]. O INRA 82 é um meio diluidor formulado para equinos que ainda não foi testado em cães [21].

O objetivo deste trabalho é estabelecer o meio diluidor e a temperatura de descongelamento mais adequados para serem utilizados em curvas de resfriamento e congelamento pré-determinadas e executadas por uma máquina computadorizada.

MATERIAS E MÉTODOS

Coleta do sêmen

Foram utilizados cinco cães, dois da raça Sharpei e três da raça Labrador, com idades entre 2 e 5 anos. Após o esgotamento das reservas espermáticas, foram coletados três ejaculados de cada animal, com intervalos de 72 horas entre as coletas, totalizando 15 ejaculados.

Protocolo de congelamento e avaliações espermáticas

O sêmen fresco foi dividido em três alíquotas de igual volume. Cada alíquota foi diluída no meio de centrifugação Glicose-EDTA [10] (pH 6,7; 429mOsm/L)

na proporção de 1:3 e centrifugada a 755xg por sete minutos. Cada *pellet* foi ressuspensionado no meio de congelamento em teste: T1 (Controle): Tris-cítrico com 20% de gema do ovo e 5% de glicerol (pH 6,8; 885mOsm/L); T2: Lactose-gema [10] com 20% de gema do ovo e 5% de glicerol (pH 6,7; 1214mOsm/L); T3: INRA 82 [14] com 2% de gema do ovo e 5% de glicerol (pH 6,8; 1125mOsm/L).

Cada tratamento teve seu volume diluído para obtenção final de 100 milhões de espermatozoides/mL e envase em palhetas de 0,5mL. As palhetas foram imediatamente colocadas na máquina (Modelo TK3000 – Tetakon, Brasil) programada para resfriá-las a $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, da temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) até 5°C . Nesta temperatura, foram mantidas em equilíbrio por 1 hora. A taxa de resfriamento entre 5°C e -120°C foi de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Atendida esta temperatura, as palhetas foram submersas e armazenadas em nitrogênio líquido até o descongelamento. No descongelamento, foram testadas as temperaturas de (A) 37°C por 30 segundos e de (B) 52°C por 10 segundos, seguida de 37°C por 30 segundos.

A motilidade progressiva foi estimada por três avaliadores experientes utilizando-se microscopia óptica entre lâmina e lamínula aquecida. Os valores apresentados correspondem à média aritmética dos resultados obtidos pelos avaliadores. A morfologia espermática foi avaliada utilizando-se microscopia de contraste de fase em amostras coletadas imediatamente após a coleta e após o descongelamento. Após o descongelamento, os espermatozoides foram submetidos ao teste hiposmótico usando uma solução de frutose a 60mOsmol/L [9] e a integridade de membranas foi avaliada pela coloração utilizando os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP), segundo a técnica descrita por [7] e modificada por [24]. Após o descongelamento, a motilidade progressiva foi avaliada a cada 30 minutos, até a mesma atingir 5%.

Análise estatística

O delineamento experimental foi blocos ao acaso com parcelas subdivididas, eliminando-se o efeito cão e testando-se os meios diluidores (parcelas) descongelados em duas temperaturas (subparcelas). Os resultados foram submetidos a ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Student Newman Keuls (5%) para os meios de congelamento e teste de Duncan (5%) para as temperaturas de descongelamento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*).

RESULTADOS

A motilidade progressiva dos espermatozoides congelados nos meios Tris-citríco-gema e lactose-gema foi melhor que a do meio INRA 82 ($p < 0,05$), tanto após o descongelamento (Tabela 1) quanto durante o teste de termorresistência, independentemente da temperatura de descongelamento ($p > 0,05$). Não houve diferença nas taxas de queda da motilidade progressiva entre os meios diluidores quando descongelados a 37°C/30s ou 52°C/10s seguido de 37°C/30s.

A média de espermatozoides morfologicamente normais foi maior nos tratamentos com Tris-citríco e lactose-gema, diferentemente do obtido para o meio INRA 82 ($p < 0,05$) (Tabela 2), independente da temperatura de descongelamento utilizada. O INRA 82 apresentou maior média de defeitos de peça intermediária (18±9,2%) que o Tris-citríco (4±1,6%) e a Lactose-gema (5±2,5%). Já o descongelamento a 52°C, independentemente do meio diluidor utilizado, apresentou médias superiores de defeitos de acrossoma (4±1,5%) e de peça intermediária (10±7,7%) que o descongelamento a 37°C (2±3% e 7,5±2,3%, respectivamente).

A reatividade ao teste hiposmótico foi semelhante entre os meios de congelamento testados (Tabela 2), independentemente da temperatura de descongelamento utilizada ($p > 0,05$), assim como a preservação da integridade funcional das membranas plasmática e acrossomal ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Vários fatores podem explicar os resultados obtidos pelos meios Tris-citríco-gema e lactose-gema na preservação de parâmetros espermáticos após o congelamento

em máquina computadorizada programada. Ambos possuem monossacarídeos, frutose e glicose, respectivamente, que servem como combustível energético para a manutenção da motilidade espermática. Os monossacarídeos também exercem um papel importante na preservação da morfologia espermática e da integridade das membranas, verificadas pelos testes de fluorescência e hiposmótico, ao possuir efeito osmótico e contribuir na diminuição do ponto crioscópico da água [17]. O dissacarídeo lactose do meio lactose-gema exerce um efeito osmótico ao não ultrapassar a membrana espermática, o que favorece a osmolaridade do meio extracelular para a preservação da integridade de membrana [15].

O INRA 82 também conseguiu manter a integridade funcional e estrutural da membrana plasmática,

Tabela 1. Motilidade progressiva de espermatozoides caninos congelados em três meios diluidores e descongelados em duas temperaturas, utilizando-se uma máquina computadorizada com curvas de resfriamento (-0.5°C/min) e congelamento (-20°C/min) programadas.

Tratamento	Motilidade progressiva (%)	
	A	B
G1	42,7±17,7 ^a	42±14,9 ^a
G2	44,3±13,1 ^a	38±5,1 ^a
G3	15,7±8,9 ^b	20±14,9 ^b

Média±desvio-padrão; a,b – Valores com sobrescritos diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Student Newman Keuls para os meios diluidores ($p < 0,05$); Não houve diferença significativa na motilidade entre temperaturas de descongelamento para os três meios testados. G1: Tris-citríco-gema; G2: Lactose-gema; G3: INRA 82; A: 37°C/30s; B: 52°C/10s seguido de 37°C/30s.

Tabela 2. Frequência de espermatozoides caninos morfologicamente normais, reativos ao teste hiposmótico (HO) e com a estrutura das membranas íntegras avaliadas pelo CFDA/IP congelados em três meios diluidores e descongelados em duas temperaturas, utilizando-se uma máquina computadorizada com curvas de resfriamento (-0.5°C/min) e congelamento (-20°C/min) programadas.

Tratamentos	Normais (%)		HO (%)		Íntegros (%)	
	A	B	A	B	A	B
G1	56±9,1 ^a	58±14,8 ^a	53±3,5 ^a	56±4,8 ^a	45±6,2 ^a	48±11,3 ^a
G2	65±11,8 ^a	69±13,9 ^a	65±5 ^a	67±9,7 ^a	39±16,8 ^a	54±8,6 ^a
G3	38±9,6 ^b	34±8,3 ^b	62±10,6 ^a	60±5,2 ^a	39±6 ^a	35±11,9 ^a

Média±desvio-padrão; a,b - Valores com sobrescritos diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), entre os meios diluidores; Não houve diferença significativa na motilidade entre temperaturas de descongelamento para os três meios testados. G1: Tris-citríco-gema; G2: Lactose-gema; G3: INRA 82; A: 37°C/30s; B: 52°C/10s seguido de 37°C/30s.

porém não obteve resultados satisfatórios na manutenção da motilidade e da morfologia espermática. Apesar da presença do leite desnatado e de carboidratos em sua composição, como glicose, lactose e rafinose [22], a quantidade de gema do ovo presente na formulação pode ter influenciado a taxa de motilidade espermática após o descongelamento. A proporção de gema do ovo indicada para meios de congelamento do sêmen canino é de 20% [20]. Enquanto o papel protetor da gema é bem conhecido no processo de congelamento, ainda não está comprovado o mesmo efeito dos componentes do leite desnatado sobre a membrana espermática [3]. Uma pesquisa testando cinco meios de congelamento para o sêmen canino verificou que, apesar do leite desnatado apresentar características favoráveis à criopreservação de sêmen, como viscosidade, fonte energética e atividade antibacteriana, ele também pode causar alterações na morfologia espermática que se refletem na motilidade [18].

As temperaturas de descongelamento não influenciaram os resultados obtidos nas avaliações da motilidade espermática, indicando que para a curva de congelamento utilizada usando máquina computadorizada esse fator não exerceu influência para esse quesito após o descongelamento. A temperatura de descongelamento pode ser alterada de acordo com o meio diluidor e a curva de congelamento. Células congeladas rapidamente podem conter pequenos cristais de gelo que, se

o descongelamento for realizado também rapidamente, geralmente não implica morte celular. Porém, se o descongelamento ocorrer lentamente, há uma reorganização dos cristais de gelo, que aumentam seu tamanho e lesionam as células [16]. A temperatura de 37°C por 30 segundos apresentou resultados favoráveis quanto à manutenção da morfologia e da integridade estrutural de membrana, sendo utilizada no descongelamento do sêmen canino [19,22]. Um autor afirma que o uso do protocolo de descongelamento à temperatura de 55°/10s para palhetas de 0,5mL é capaz de obter resultados de motilidade espermática satisfatórios, porém ele não foi eficaz na preservação da morfologia normal do acrossoma e da peça intermediária no presente trabalho [5].

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que os meios diluidores Tris-cítrico-gema e lactose-gema foram mais eficientes na manutenção da viabilidade espermática para o protocolo de congelamento utilizado. O meio INRA 82 foi menos eficiente em preservar a motilidade espermática e a morfologia após o descongelamento em cães. A temperatura de descongelamento a 52°C/10s seguido de 37°C/30s causou maior porcentagem de defeitos acrossomais e da peça intermediária.

Agradecimentos. À Fapemig, pelo suporte financeiro, e à empresa Tetakon, pelo empréstimo da máquina de congelamento.

REFERÊNCIAS

- 1 **Álamo D., Batista M., González F., Rodríguez N., Cruz G., Cabrera F. & Gracia A. 2005.** Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*. 63: 73-82.
- 2 **Batista M., Álamo D., González M.G., Cruz M.G. & Gracia A. 2006.** Influence of the freezing technique (Nitrogen liquid vs ultrafreezes of -152°C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. 41: 423-428.
- 3 **Bergeron A. & Manjunath P. 2006.** New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*. 73: 1338-1344.
- 4 **Bueno R., Costa E.P., Guimarães J.D. & Valentim F.M. 2001.** Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. II – Efeito do protocolo de resfriamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 53: 372-379.
- 5 **Eilts B.E. 2005.** Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*. 64: 692-697.
- 6 **Graham J.K. & Mocé E. 2005.** Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 64: 492-504.
- 7 **Harrison R.A.P. & Vickers S.E. 1990.** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88:343-352.
- 8 **Hori T., Odaka S., Oba H., Mizutani T., Kawakami E. & Tsutsui T. 2006.** Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. *Journal of Veterinary Medicine and Science*. 68: 1055-1061.
- 9 **Kumi-Diaka J. 1993.** Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*. 39: 1279-1289.
- 10 **Martin J.C., Klug E. & Günzel A.R. 1979.** Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*. 27 (Suppl 1): 47-51.

- 11 Nöthling J.O. & Shuttleworth R. 2005.** The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology.* 63: 1469-1480.
- 12 Nöthling J.O., Dolieslager S.M.J., Fillekes R. & Colenbrander B. 2007.** Thawing dog spermatozoa in just-boiled water: Submersion time and effect on sperm quality compared to thawing in water at 70°C. *Theriogenology.* 68: 530-537.
- 13 Oliveira E.C.S., Juliani G.C., Henry M. & Marques Jr. A.P. 2003.** Viabilidade *in vitro* do sêmen canino submetido a congelamento com diferentes diluidores e crioprotetores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 27: 363-365.
- 14 Palmer E. 1984.** Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: *Proceedings of the 10 International Congress on Animal Reproduction Artificial Insemination.* v.3. (Illinois, EUA). p. 377-378.
- 15 Peña A.I. 1997.** Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion-descongelacion. 329f. Lugo, Galicia. Tese (Doutorado em Veterinária) – Universidade de Santiago de Compostela.
- 16 Peña F.J., Núñez-Martínez I. & Morán J.M. 2006.** Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals.* 41 (Suppl 2): 21-29.
- 17 Rodriguez-Gil J.E. 2006.** Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reproduction in Domestic Animals.* 41(Suppl 2): 11-20.
- 18 Santos S.E.C., Vannucchi C.I., Satzinger S., Assumpção M.E.O.D. & Visintin J.A. 1999.** Comparison of five extenders for canine semen freezing. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 36: 1-11. [Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=1413-959619990005&lng=en&nrm=iso].
- 19 Santos S.E.C., Vannucchi C.I., Satzinger S. & Visintin J.A. 2001.** Comparação de dois crioprotetores na congelamento de sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 25: 472-473.
- 20 Silva A.R., Cardoso R.C.S. & Silva L.D.M. 2000.** Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. *Ciência Rural.* 30: 1021-1025.
- 21 Vidament M., Yvon J.M., Couty I., Arnaud G., Nguekam-Feugang J., Noue P., Cottron S., Le Tellier A., Noel F., Palmer E. & Magistrini M. 2001.** Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Animal Reproduction Science.* 68: 201-218.
- 22 Yildiz C., Kaya A., Aksoy M. & Tekeli T. 2000.** Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology.* 54: 579-585.
- 23 Yu I., Songsasen N., Godke R.A. & Leibo S.P. 2002.** Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology.* 44: 62-78.
- 24 Zúccari C.E.S.N. 1998.** Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. 121f. Botucatu, SP. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista.