



## Estudo da viabilidade de um novo diluidor para a refrigeração do sêmen canino

*Study of new extender viability to canine chilled sperm*

Bethania Vieira Lopes<sup>1</sup>, Isabel Candia Nunes da Cunha<sup>1,4</sup>, Frederico Ozanan Papa<sup>2</sup>, Edenio Detmann<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CCTA / LRMGA, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes, RJ

<sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, SP

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

<sup>4</sup>Correspondência: [cunhaicn@uenf.br](mailto:cunhaicn@uenf.br)

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade espermática após 102 horas de refrigeração, utilizando um novo diluidor para o sêmen canino. Foram utilizadas oito frações espermáticas do ejaculado de diferentes cães. Foram avaliados: motilidade e vigor espermáticos e integridade de membrana para prever a viabilidade espermática. Após a coleta e as avaliações iniciais, as frações espermáticas foram divididas em duas alíquotas. Uma alíquota foi destinada ao grupo-controle (G1) com o meio Kenney, e a outra com o diluente Botu-Semen®, produzido pela Biotech-Botucatu (G2). Após a diluição e as análises iniciais de motilidade e vigor, cinco alíquotas foram destinadas à avaliação logo após diluição (M0), após 6 (M1), 30 (M2), 54 (M3), 78 (M4), e 102 (M5) horas de refrigeração. A motilidade e o vigor espermáticos foram mensurados em todos os momentos, e a integridade de membrana apenas em M1 e M5. Os valores médios de motilidade durante as avaliações em M0, M1, M2, M3, M4 e M5 foram 91,2; 80,6; 68,1; 60,0; 50,6 e 38,8% para G1 e 91,2; 80,0; 75,6; 67,5; 56,2; 45,0 % para G2. Para o vigor espermático, nos mesmos tempos de avaliação, os valores médios foram 4,207; 3,687; 2,875; 2,500; 2,187; 1,500 para G1 e 4,207; 3,750; 3,562; 3,187; 2,437; 1,912 para G2. A análise da integridade de membrana mostrou 63,2 e 28,8 % de células íntegras em G1 e 69,7 e 45,1 % em G2, durante M1 e M5, respectivamente. O meio Botu-Semen® preservou melhor a integridade da membrana plasmática de espermatozoides caninos. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que, após 102 horas de refrigeração a 5°C, é possível encontrar espermatozoides vivos e viáveis nestes meios.

**Palavras-chave:** cães, diluente, sêmen refrigerado,

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the sperm viability after 102 hours from refrigeration, using a new diluent for canine sperm. It was used eight sperm rich fractions from different dogs, and submitted to evaluation of sperm motility, vigor and plasma membrane status to predict sperm viability. After collection and initial evaluations, the sperm rich fractions were divided into two groups: G1 (control- Kenney's diluent) and G2 (Botu-semen®, Biotech Botucatu). After extension and first analysis for motility and vigor, it was made five aliquots, that were submitted to evaluations immediately after extension (M0), after 6 (M1), 30 (M2), 54 (M3), 78 (M4), and 102 (M5) hours of cooling. Motility and vigor were measured in all times but membrane integrity only at M1 and M5. The average results for motility at M0, M1, M2, M3, M4 e M5 were: 91,2; 80,6; 68,1; 60,0; 50,6 and 38,8% (G1) and 91,2; 80,0; 75,6; 67,5; 56,2; 45,0 % (G2). Velocity score at the same times were 4,207, 3,687; 2,875, 2,500, 2,187, 1,500 for G1 and 4,207, 3,750, 3,562, 3,187, 2,437, 1,912 for G2. The results for plasma membrane status at M1 and M5 were 63.2 and 28.8 % (G1) and 69.7 e 45.1 % (G2) of cells with intact membrane. The Botu-Semen® diluent (G2) had preserved better the sperm membrane integrity. Based on the results found at this experiment, we can conclude that after 102 hours of cooling, at 5°C, it is possible to find live and viable sperm on that diluents.

**Keywords:** dog, diluent, chilled semen.

Atualmente, um filhote de raça pura tem alto valor comercial, fazendo com que a criação de cães deixasse de ser um *hobby* para virar uma atividade rentável. Visando atender a esse mercado, o estudo e o aprimoramento das técnicas da reprodução, como a técnica de conservação do sêmen por refrigeração, fizeram-se necessários (Cunha e Lopes, 2000; Peña, 2000; Silva *et al.*, 2002). Além disso, mais estudos sobre essa espécie se justificam pelo fato de ela servir como modelo experimental para algumas espécies em vias de extinção.

Para que o sêmen possa ser refrigerado, ele deve ser devidamente diluído. Desta maneira, ele terá sua durabilidade estendida e poderá ser transportado. O diluidor tem como função proteger a membrana do espermatozoide contra o choque térmico e as injúrias mecânicas causadas pelo transporte, além de fornecer nutrientes e estabilizar o pH do meio (Concannon e Battista, 1989; Feldman e Nelson, 1996; Cunha e Lopes, 2000, Verstegen *et al.*, 2005).

A conservação pelo frio é utilizada até hoje e vem sendo objeto de pesquisa, visando aprimorar as técnicas de refrigeração e congelamento do sêmen. O uso de inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado possui maior flexibilidade do que com sêmen a fresco (Silva *et al.*, 2002), uma vez que, quando o sêmen é adequadamente diluído e refrigerado, os espermatozoides podem se manter vivos e viáveis por 24 horas e, dependendo do meio diluidor, por até cinco dias (Feldman e Nelson, 1996).

A melhor maneira de se avaliar a funcionalidade de um diluidor é através da determinação da taxa de concepção, mas essa avaliação nem sempre é viável em condições experimentais. Entretanto, podem ser avaliadas algumas características dos espermatozoides fundamentais para o processo de fertilização, tais como: motilidade, vigor espermático e integridade das membranas espermáticas. Uma boa motilidade e vigor espermáticos são importantes para que o espermatozoide chegue até a tuba uterina e ultrapasse envoltórios do oócito (Rota *et al.*, 1995; Cunha e Lopes, 2000).

Um dos diluidores mais usados para refrigeração de sêmen atualmente é o meio à base de leite desnatado e glicose, proposto por Kenney *et al.* (1975). Esse diluidor já foi testado por Cunha e Lopes (2000) com sêmen refrigerado de cão por até 72 horas, obtendo resultados satisfatórios: cerca de 70% de espermatozoides com membrana íntegra e 60 % de motilidade e 2 de vigor espermático.

Um novo diluidor comercial para refrigeração de sêmen, o Botu-Semen<sup>®</sup>, distribuído pela empresa Biotech- Botucatu, tem apresentado ótimos resultados para a refrigeração e transporte de sêmen na espécie equina (Papa, 2003).

Sendo o momento exato da ovulação um processo que ainda não pode ser facilmente detectado na cadela, recomenda-se que seja feita mais de uma inseminação durante o estro para garantir que haverá sêmen no trato reprodutivo da fêmea no momento da maturação oocitária (Concannon e Battista, 1989).

Devido a essa necessidade, um dos principais empecilhos para uma maior disseminação da IA com o sêmen refrigerado, na espécie canina, é o preço do envio. Assim, busca-se uma alternativa que seja capaz de diminuir esse gasto. Uma possibilidade é a utilização de um meio diluidor capaz de conservar as características fertilizantes do espermatozoide por um período de 102 horas, período este capaz de permitir a realização de três inseminações em dias alternados.

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino por um período de 102 horas comparando-se dois diluidores: o Botu-Semen<sup>®</sup> (Biotech-Botucatu) e o meio à base de leite desnatado proposto por Kenney *et al.* (1975) utilizando-se como parâmetros a avaliação da motilidade, o vigor espermático e a integridade de membrana espermática.

No presente trabalho, foram utilizados oito cães adultos de diferentes raças e com idades variadas, sendo eles de propriedade particular da cidade de Campos dos Goytacazes -RJ. Para a seleção dos doadores, foi feita avaliação clínica, exame andrológico e espermiograma, participando do experimento aqueles que se encontravam livres de doenças infecto-contagiosas e que apresentaram um bom escore corporal, entre 3 e 4. Essa análise foi realizada de acordo com o sistema de avaliação da condição corporal da Nestlé PURINA<sup>®</sup>, resultado de estudos sobre nutrição canina (LaFlamme, 1997; Kelley, 2001).

O sêmen foi coletado, sempre pelo mesmo técnico, utilizando-se o método de manipulação digital descrito por Feldman e Nelson (1996). Vale salientar que apenas a segunda fração, ou fração espermática, do ejaculado foi utilizada. Logo após a coleta, a fração espermática foi avaliada quanto à morfologia espermática, e apenas amostras que obtiveram um percentual de patologias menor do que 30% participaram do experimento. Com a finalidade de diminuir os riscos de ferimentos, todo o material utilizado nas coletas era de plástico.

As avaliações da motilidade e vigor espermáticos foram realizadas segundo método descrito por Feldman e Nelson (1996). Uma gota de sêmen foi colocada sobre lâmina aquecida (38-40°C) e recoberta por lamínula. O exame foi realizado com o auxílio de um microscópio de contraste de fase, e o resultado obtido, expresso em porcentagem, para a motilidade, e por meio de um escore variando de zero a cinco (0-5), para o vigor (Manual, 1998).

A avaliação da integridade das membranas espermáticas, utilizando uma coloração fluorescente à base de 6-carboxifluoresceína, foi realizada seguindo o protocolo descrito por Lopes *et al.* (2005). Resumidamente, as soluções de estoque foram: de Fluoresceína (9,2mg de 6-carboxifluoresceína diacetato com 20mL de DMSO) e de Formaldeído (solução 1:80 de formalina 40%, em solução fisiológica). Diluíram-se 10µl da amostra de sêmen em 40µl da solução de trabalho (solução estoque de Fluoresceína 20µl, solução de formaldeído 10µl e Citrato de Sódio 3% 0,96ml). A solução de trabalho foi sempre preparada no momento da avaliação microscópica, sendo ela realizada entre lâmina e lamínula sob microscópio de epifluorescência, com aumento de 400x. Foram contadas 200 células espermáticas em campo claro e, imediatamente após, o mesmo campo foi verificado sob epifluorescência, sendo anotado o número de células emitindo fluorescência verde (carboxifluoresceína) e foram classificadas como células íntegras, aquelas que emitiam fluorescência verde. As células que não emitiam fluorescência sob excitação epifluorescente, mas que puderam ser contadas quando observadas em campo claro, foram classificadas como lesadas. O número de espermatozoides íntegros foi expresso em porcentagem.

A fração espermática foi, imediatamente após coleta e avaliações iniciais, dividida em duas amostras iguais, e cada amostra foi diluída até o volume final de 10ml, formando dois grupos:

**G1** (grupo controle)- o sêmen foi diluído no meio proposto por Kenney *et al.* (1975);

**G2**- o sêmen foi diluído em meio Botu-Semen<sup>®</sup>.

O volume total (10ml) constituinte de cada grupo foi dividido em cinco alíquotas de 2ml cada, que foram acondicionadas em tubos plásticos de 15ml. Logo após a divisão dos grupos e antes da refrigeração, foram feitas as análises iniciais de motilidade e vigor, sendo considerado este o momento zero (**M0**) de cada grupo.

As cinco alíquotas de cada grupo foram levadas à refrigeração em geladeira doméstica à temperatura de  $5,0 \pm 1,7$  °C. A temperatura ambiente do laboratório onde foram realizadas as avaliações e o processo de refrigeração foi mantida em  $25 \pm 1$ °C.

Para cada grupo, uma das alíquotas refrigeradas foi utilizada para a avaliação em cada um dos seguintes momentos: seis horas (**M1**), trinta horas (**M2**), cinquenta e quatro horas (**M3**), setenta e oito horas (**M4**) e cento e duas horas (**M5**) após a refrigeração. Todas as avaliações foram realizadas após um prévio aquecimento em banho-maria, a uma temperatura média de 35°C, por dez minutos. Em todos os momentos, foram avaliados a motilidade e o vigor espermático. Em M1 e M5, foi mensurada ainda a integridade da membrana espermática.

O experimento seguiu o delineamento em blocos completos casualizados em esquema de sub-blocagem em função dos ejaculados avaliados.

As análises dos diferentes diluidores em função dos momentos de avaliação foram realizadas em esquema de medidas repetidas no tempo (Litell *et al.*, 1998), centrando-se nas hipóteses básicas de horizontalidade, paralelismo e coincidência dos perfis temporais (Harris, 1975). As avaliações adicionais basearam-se em contrastes polinomiais. Para todos os procedimentos, adotou-se  $\alpha = 0,05$ .

Para avaliação dos diluentes, foram realizadas análises de motilidade e vigor espermático além de avaliação da integridade de membrana espermática. Esses parâmetros indicam, fortemente, a fertilidade do ejaculado (Hermansson e Linde-Forsberg, 2006), uma vez que o espermatozóide precisa se locomover rapidamente e necessita ter suas membranas íntegras, para o processo de capacitação, reação de acrossoma e posterior fertilização. Para tanto, é preciso uma alteração estrutural fisiológica da membrana do espermatozóide, o que somente é possível com uma membrana espermática íntegra (Rota *et al.*, 1995).

As análises revelaram que, em M0, os valores de motilidade (91,25%) e vigor espermático (4,07) médios estavam de acordo com os valores relatados por Feldman e Nelson (1996), Jonhston *et al.* (2001), Silva *et al.* (2002) e Silva (2002).

Na análise estatística, verificou-se que apenas o efeito linear foi significativo ( $P < 0,01$ ). Assim, pode-se dizer que o processo de refrigeração atuou de maneira semelhante nos dois grupos analisados. Tanto a queda da motilidade quanto a do vigor espermático foram gradual, uniforme e linear.

Todas as variáveis analisadas neste experimento (motilidade e vigor espermático e integridade de membrana) tiveram uma queda no seu valor, no decorrer do trabalho experimental (Fig. 1, 2 e 3). Observou-se que houve diferença estatística, entre grupos ( $P < 0,01$ ), apenas na porcentagem de células íntegras após um período de 102 horas de refrigeração (Tab. 1). Analisando a Fig. 3, pode-se observar uma superioridade no grupo onde o sêmen fora diluído e refrigerado com o meio Botu-Semen<sup>®</sup> (G2).

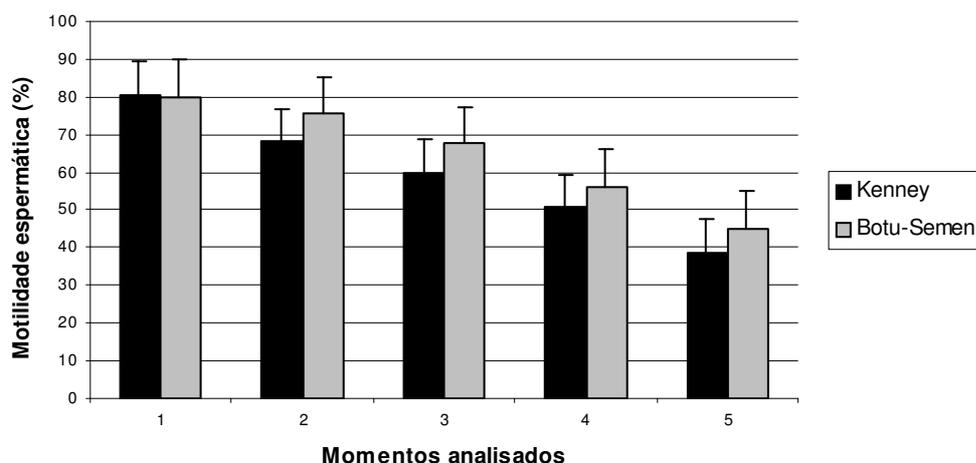


Figura 1. Gráfico demonstrativo do comportamento da motilidade espermática (%) ao longo do processo de refrigeração do sêmen de cão por 102 h utilizando os diluidores Kenney e Botu-semen<sup>®</sup>.

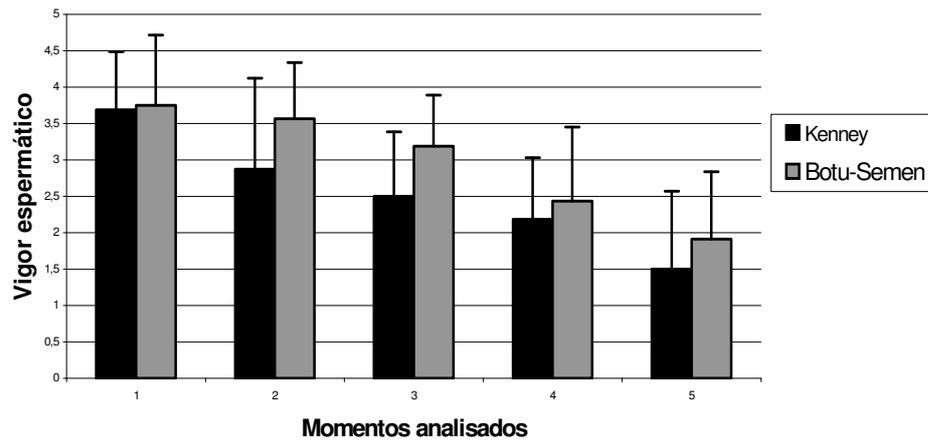


Figura 2. Gráfico demonstrativo do comportamento vigor espermático (0-5) ao longo do processo de refrigeração do sêmen de cão por 102 h utilizando os diluidores Kenney e Botu-Semen®.

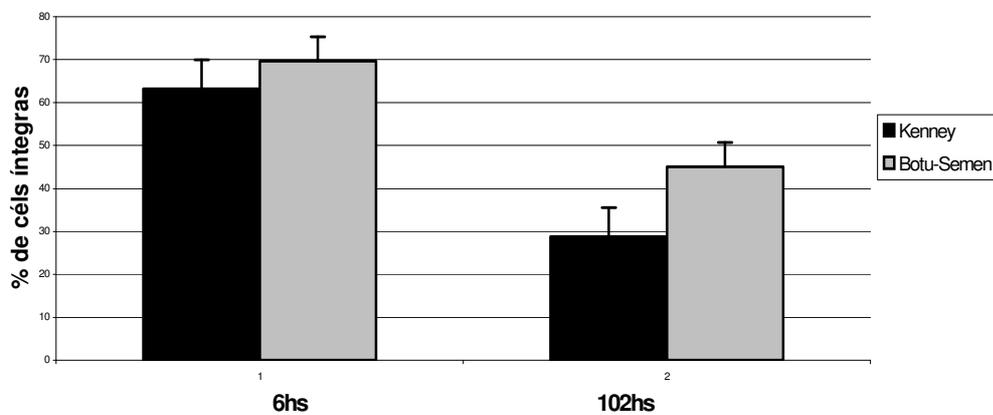


Figura 3. Gráfico demonstrativo da porcentagem de células íntegras ao longo do processo de refrigeração do sêmen de cão por 102 h utilizando os diluidores Kenney e Botu-Semen®.

Tabela 1. Níveis descritivos de probabilidade para o erro tipo I associados às hipóteses de avaliação dos atributos integridade, motilidade e vigor ( $\alpha = 0,05$ ) para o sêmen canino refrigerado por 102 horas.

Hipótese	Atributo		
	Integridade	Motilidade	Vigor
Horizontalidade	<0,0001	<0,0001	0,0084
Coincidência	0,0019	0,1788	0,2026
Paralelismo	0,1584	0,2061	0,0899

Horizontalidade: efeito do tempo nos resultados encontrados.

Coincidência: efeito do diluente nos resultados encontrados.

Paralelismo: interação do efeito do tempo com o diluente sobre os resultados.

O resfriamento provoca mudanças na estrutura da bicamada lipídica e, assim, na função da membrana plasmática. Quando uma membrana biológica é resfriada, ocorre possivelmente uma reorganização dos componentes membranários, e alguns lipídios que normalmente encontram-se adjacentes às proteínas da membrana poderiam agregar-se, deixando as proteínas livres para ligarem-se a novas substâncias. Todos esses processos podem levar a uma alteração na permeabilidade, podendo causando a sua ruptura (Rodriguez-Martinez et al., 1993, Hermansson e Linde-Forsberg, 2006). Acredita-se que, na composição do meio Botu-Semen®, exista alguma substância capaz de promover maior proteção à membrana espermática durante esse período. Mas, sendo este um meio comercial, não se pode especificar qual seria o componente responsável por essa proteção.

Neste trabalho, foi encontrada uma alta correlação ( $r^2 = 0,95$ ) entre a motilidade espermática e a porcentagem de células com membranas íntegras. Isto pode ser explicado pelo fato de que uma célula com membrana lesada tem sua capacidade de transporte alterada, assim como tem seu metabolismo diminuído, o que resulta em uma queda de motilidade e de vigor espermáticos. Resultados similares foram relatados por Kumi-Diaka (1993), Rota (1995) e Cunha e Lopes (2000).

O tempo de refrigeração de 102 horas foi testado pelo fato de permitir três IA em dias alternados com



apenas uma coleta e envio. Com esse propósito, os dois meios mostraram-se bastante eficazes, já que, para as duas primeiras IAs (após 6 e 48 horas de refrigeração), teriam valores médios de motilidade e vigor espermáticos próximos daqueles preconizados pelo CBRA. No momento da terceira IA, após 102 horas, os valores apresentavam-se mais baixos quando comparados com o sêmen fresco, porém mais altos do que aqueles encontrados com sêmen congelado. Isto leva a crer que, assim como o congelado, esse sêmen também é capaz de fertilizar. Para compensar essa baixa qualidade, pode-se utilizar um maior número de espermatozoides por dose inseminante (Hermansson e Linde-Forsberg, 2006).

Diante dos resultados obtidos, recomenda-se o uso do meio Botu-Semen®, que, após 102 horas de refrigeração, apresentou melhores resultados na conservação da integridade da membrana espermática. Outras vantagens do meio Botu-Semen® consistem no fato de que, sendo um meio disponível no mercado, torna-se um meio prático e acessível para todos, principalmente para aqueles profissionais que não têm acesso a laboratórios e, desta maneira, não podem preparar seu próprio diluidor. Além disso, como os ejaculados refrigerados com o meio Botu-Semen® apresentaram maior capacidade na preservação das características seminais iniciais do que o meio Kenney *et al.* (1975), acredita-se que a taxa de fertilização no primeiro seja superior ao segundo.

Os resultados deste experimento mostram que o sêmen canino pode ser refrigerado, a 5°C, por 102 horas nos meios Kenney e Botu-Semen®. No entanto, este último proporciona uma melhor conservação. De acordo com os resultados aqui encontrados, pode-se concluir que os diluidores testados podem ser utilizados para a refrigeração do sêmen canino por pelo menos 102 horas. Além disso, o meio Botu-Semen® constitui uma nova alternativa para a refrigeração do sêmen canino, sendo de fácil acesso e tendo um preço acessível. Entretanto, fazem-se necessários testes *in vivo* para avaliação de taxa de concepção desses dois diluidores.

### Referências

- Concannon PW, Battista M.** Canine semen freezing and artificial insemination. *In: Kirk RW.* (Ed.). *Current veterinary therapy, small animal practice.* Philadelphia: W.B Saunders, 1989. p.1247-1259.
- Cunha ICN, Lopes MD.** Estudo do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores a base de leite e glicina-gema. *Rev Educ Contin CRMV/SP*, v.3, p.37-42, 2000.
- Feldman EC, Nelson RW.** *Canine and feline endocrinology and reproduction.* Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p.487.
- Harris RJ.** *A primer of multivariate statistics.* New York: Academic Press, 1975.
- Hermansson U, Linde-Forsberg C.** Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.65, p.584–593, 2006
- Jonhston, S.D., Kustritz, M.R.V., Olson, P.N.S.** *Canine and feline theriogenology.* Philadelphia, W.B. Saunders. p. 592, 2001
- Kelley RL.** Factors influencing canine reproduction and nutritional management of the pregnant bitch. *In: Canine reproduction and neonatal health: tufts animal Expo 2001.* [s.l.]: The Iams Co, 2001. p.9-14.
- Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL, Morse GW.** Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. *In: Annual convention American Association Equine Practitioners*, 21, 1975, Boston. *Proceedings...* Boston: AAEP, 1975. p.327.
- Laflamme DP.** Development and a validation of a body condition score system for dogs. *Can Pract*, v.22, p.10-15, 1997.
- Littell RC, Henry PR, Ammerman CB.** Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci*, v.76, 1216-1231, 1998.
- Lopes BV, Cunha ICN, Rocha AA.** Avaliação da integridade de membrana espermática de cães utilizando sonda fluorescente diacetato de carboxifluoresceína. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, 2005, Goiânia, GO. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2005. (CD-ROM).
- Kumi-Diaka J.** Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v.39 p.1279-1289, 1993.
- Manual** para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA, 1998. p.65.
- Peña AI.** *Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity.* 2000. Thesis (Doctoral) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2000.
- Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C.** Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, v.44, p.885-900, 1995
- Rodriguez-Martinez JH, Ekwall H, Linde-Forsberg C.** Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog espermatozoide. *J Reprod Fertil*, v.47, p.279–285, 1993.
- Silva AR.** Avaliação andrológica de cães e gatos. *Rev Bras Reprod Anim. Suppl*, n.5, p.52-55, 2002.
- Silva LDM, Silva AR, Cardoso RCS.** Inseminação artificial em cães. *In: Gonsalves PBD* (Ed.) *Biotécnicas aplicadas a reprodução animal.* São Paulo: Varela, 2002. p.69-95.
- Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouada M.** Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: *in vitro* and *in vivo* studies. *Theriogenology*, v.64, p.720-733, 2005.