

## Métodos de congelamento *One Step* e *Two Steps* do sêmen de cães, diluído em solução de água de coco e etilenoglicol

*“One Step and Two Steps” freezing methods of dog’s semen in coconut water and ethylene glycol extender*

GODIM, Débora<sup>1</sup>; CASTRO, Ana Cristina Nery de<sup>1</sup>; VIDAL, Marceline<sup>1</sup>; FERREIRA, Marco Antonio da Rocha<sup>1</sup>; CURY, Leopoldo José<sup>2</sup>; PINHO, Tânia Góes de<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Pós-graduação em Clínica e Reprodução, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

\*Endereço para correspondência: e.fuchs@terra.com.br

### RESUMO

Objetivou-se, com este estudo, verificar a influência dos métodos de congelamento, *One Step* e *Two Steps*, na viabilidade espermática em cães. Foram utilizados 20 ejaculados de 11 cães, previamente selecionados, que apresentaram motilidade progressiva acima de 70% e vigor igual ou superior a três. As amostras foram congeladas em meio composto de água de coco e etilenoglicol, pelos métodos de *One* e *Two Steps*, e avaliadas após descongelamento, quanto à motilidade progressiva, vigor, porcentagem de espermatozoides vivos e integridade de membrana plasmática. Após o processo de diluição e congelamento *One Step* e *Two Steps*, verificou-se que não houve diferença ( $P>0,05$ ) nas características seminais, cujos resultados (média  $\pm$  desvio padrão) foram, respectivamente, de  $47,3\% \pm 16,6\%$  e  $50,5\% \pm 17,4\%$  para motilidade progressiva;  $2,64 \pm 0,67$  e  $2,9 \pm 0,74$  para o vigor;  $52,2\% \pm 24,16\%$  e  $52,2\% \pm 24,48\%$  para porcentagem de espermatozoides vivos e de  $15,27\% \pm 10,19\%$  e  $23,3\% \pm 11,6\%$  para a integridade de membrana plasmática. A ausência de diferenças entre as características avaliadas para o sêmen congelado, permite inferir que as técnicas *One Step* e *Two Steps* podem ser utilizadas para a criopreservação do sêmen de cães.

**Palavras-chave:** biotecnologia da reprodução, criopreservação, inseminação artificial

### SUMMARY

The objective of this study was to verify the influence of *One Step* and *Two Steps* freezing methods on dog’s spermatic viability. The experiment was performed using 20 ejaculates from 11 previously selected dogs which presented progressive motility over 70% and vigor equal or superior to 3. The samples were frozen in medium composed by coconut water and ethylene glycol as crioprotectant by the methods, *One* and *Two Steps*. After thawing, progressive motility, vigor, live spermatozoa percentage and plasmatic membrane integrity were evaluated. The results showed that there was no difference ( $P>0.05$ ) in evaluated seminal characteristics. For progressive motility, the results (mean  $\pm$  standard deviation) were respectively for *One* and *Two Steps*,  $47.3\% \pm 16.6\%$  and  $50.5\% \pm 17.4\%$ . As well as, the results for vigor, live spermatozoa percentage, plasmatic membrane integrity were  $2.64 \pm 0.67$  and  $2.9 \pm 0.74$ ;  $52.2\% \pm 24.16$  and  $52.2\% \pm 24.48\%$ ;  $15.27\% \pm 10.19\%$  and  $23.3\% \pm 11.6\%$  for *One* and *Two Steps* methods, respectively. In conclusion, the *One Step* and *Two Steps* techniques can be used as semen cryopreservation methods in dog’s assisted reproduction and there is no difference between the evaluated characteristics of frozen-thawed semen using one or other technique.

**Keywords:** artificial insemination, biotechnology, cryopreservation

## INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen de cães é uma biotecnologia muito utilizada, porém novas técnicas para acompanhar a demanda têm sido implantadas, e estas objetivam principalmente, a praticidade e eficiência dos protocolos de conservação do sêmen e minimizar os danos da criopreservação sobre a célula espermática. Em estudo conduzido por Cardoso et al. (2002), foi evidenciada a recuperação de um maior número de células viáveis à inseminação artificial. No intuito de identificar melhores resultados na criopreservação, diversos diluidores têm sido testados, dentre eles a água de coco que foi utilizada como diluidor de sêmen de caprinos, ovinos e atualmente também, de sêmen de cães, por possuir características desejáveis na conservação do sêmen e sobre o metabolismo espermático (AZEVEDO & TONIOLLI, 2000; CAMPOS et al., 2002; CARDOSO et al., 2002). A água de coco, *in natura*, apresenta uma osmolaridade em torno de 500 mOsmol/L e pH de 4,5 a 5,0, devendo-se ajustar a osmolaridade para 300 a 310 mOsmol/L e o pH para 6,2 a 6,7, adequados ao sêmen de cães, usando-se água destilada e uma solução de citrato de sódio a 5% (CARDOSO, 2002; SILVA, 2001).

A ação crioprotetora do diluidor é de fundamental importância na futura viabilidade do sêmen congelado, de maneira a evitar danos derivados de processos físicos da congelação. Os tipos e concentrações de crioprotetores utilizados nos diluidores e o método de sua adição ao sêmen, são objeto de várias pesquisas (OLIVEIRA et al., 1999; CASTRO et al. 2007). O crioprotetor pode ser adicionado ao sêmen a 37°C ou a 5°C (PEÑA et al., 1998; CAVALCANTI et al., 2002) e o período de equilíbrio, após a sua adição,

varia de uma hora a quatro horas (OLAR et al., 1989). Em razão de ambos os aspectos terem influência na qualidade do sêmen após o descongelamento, objetivou-se comparar as técnicas de congelamento *One Step*, que consiste em diluir o sêmen com o diluidor contendo o crioprotetor à temperatura de 37°C e submetê-lo à refrigeração por uma hora para equilíbrio antes do congelamento e *Two Steps*, na qual o crioprotetor é adicionado resfriado (5°C) ao sêmen pré-diluído e sob a mesma temperatura. Buscou-se verificar a influência dos dois métodos de congelamento na viabilidade do sêmen de cães, diluído em meio à base de água de coco.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 11 cães hípidos, sexualmente maduros, com idade variando de um ano e meio a sete anos, de diferentes raças, proveniente de criatórios do Estado do Rio de Janeiro. O sêmen foi coletado por manipulação digital e imediatamente avaliado quanto à motilidade progressiva e vigor. Somente fizeram parte do experimento as amostras que apresentaram motilidade progressiva acima de 70% e vigor igual ou superior a três (20 ejaculados no total). As amostras selecionadas de sêmen fresco foram também avaliadas, quanto à porcentagem de espermatozoides vivos, utilizando o corante eosina. A integridade de membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada pelo Teste Hiposmótico e este foi realizado com a preparação de duas amostras de sêmen, uma em solução hiposmótica (150 mOsmol/L) e outra em solução isosmótica (300 mOsmol/L). Posteriormente tais amostras foram

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). Cada ejaculado foi dividido em duas frações iguais, que foram diluídas por meio dos protocolos *One Step* (G1) e *Two Steps* (G2).

A osmolaridade da água de coco utilizada como diluidor, foi ajustada para 300 a 310 mOsmol/L e o pH para 6,2 a 6,7. Neste procedimento, foram adicionadas água destilada e solução de citrato de sódio a 5% (CARDOSO, 2000; SILVA, 2001).

No método *One Step*, o sêmen foi diluído à temperatura de 37°C, na proporção 1:1 com diluidor base, contendo 50% de água de coco, 25% de água destilada e 25% de solução de citrato de sódio a 5% e 6% do crioprotetor etilenoglicol. Em seguida foi envasado em palhetas de 0,5 mL e colocado em caixa isotérmica a uma temperatura de 5°C durante 1 hora.

No método *Two Steps*, o sêmen foi inicialmente pré-diluído na proporção 1:0,5, com o diluidor base, na temperatura de 37°C e resfriado em caixa isotérmica (5°C) por 1 hora. Em seguida, adicionou-se solução resfriada (5°C) de 12% de etilenoglicol em diluidor base, em volume suficiente para completar a diluição final de 1:1. Concluída a adição, obteve-se a diluição do sêmen de 1:1 e 6% de crioprotetor no diluidor. Após a diluição final o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL.

Realizou-se o congelamento das amostras em bandejas expostas ao vapor de nitrogênio durante 20 minutos, em caixa isotérmica, a uma distância de 5 cm da superfície do nitrogênio líquido. A seguir, as palhetas foram

mergulhadas no nitrogênio líquido, permanecendo imersas por dez minutos e posteriormente armazenadas em botijão criobiológico, contendo no seu interior nitrogênio líquido (-196°C).

As palhetas foram descongeladas em banho-maria, a 37°C por 30 segundos e o sêmen avaliado quanto à motilidade progressiva, vigor espermático, percentual de espermatozóides vivos e integridade da membrana plasmática dos espermatozóides.

Realizou-se análise descritiva (médias e desvios-padrão) para cada variável estudada no sêmen. Na comparação dos resultados dos diferentes grupos experimentais, utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon, a fim de comparar duas amostras pareadas (antes e depois do congelamento) e o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, para a comparação dos dois métodos de congelamento. Em todas as comparações admitiu-se um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se uma redução dos valores das características do sêmen estudadas ( $P < 0,05$ ), após a criopreservação em relação ao sêmen fresco (Tabela 1). Os resultados observados neste estudo estão de acordo com os obtidos por Peña et al. 1998; Oliveira et al. 1999; Silva et al. 2000 e Cardoso et al. 2002, podendo ser explicado por fatores como, o choque térmico e as alterações irreversíveis da membrana plasmática, causadas pelo processo de criopreservação (HOLT, 2000).

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrões das características do sêmen de cães, fresco e criopreservado pelas técnicas *One Step* (G1) e *Two Steps* (G2)

Grupos	Motilidade progressiva (%)	Vigor espermático (0-5)	Espermatozóides vivos (%)	Membranas plasmáticas íntegras (%)
Sêmen Fresco	86,8 ± 8,45 <sup>a</sup>	4,36 ± 0,67 <sup>a</sup>	87,45 ± 7,49 <sup>a</sup>	61,73 ± 21,59 <sup>a</sup>
G1	47,3 ± 16,6 <sup>b</sup>	2,64 ± 0,67 <sup>b</sup>	52,2 ± 24,16 <sup>b</sup>	15,27 ± 10,19 <sup>b</sup>
G2	50,5 ± 17,4 <sup>b</sup>	2,9 ± 0,74 <sup>b</sup>	52,2 ± 24,48 <sup>b</sup>	23,3 ± 11,6 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Valores na mesma coluna seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente (P<0,05).

Os valores médios de motilidade progressiva nos grupos G1 e G2 foram semelhantes aos encontrados por Peña et al. (1998), que verificaram valores de 48,6% ± 7,4% e 43,6% ± 12,1% e superiores aos observados por Oliveira et al. (1999), utilizando a técnica de *One Step* (36,9% ± 16,42%) e por Thomas et al. (1993) na técnica de *Two Steps* (33,1% ± 2,3%). Os resultados da motilidade progressiva no sêmen congelado foram satisfatórios em ambas as técnicas de congelamento, pois se encontram dentro dos padrões considerados viáveis, para a inseminação artificial com sêmen criopreservado (CASTRO et al., 2007). O vigor espermático médio após o descongelamento foi de 2,64 ± 0,67 para G1 e 2,9 ± 0,74 para G2. Apesar desta característica estar abaixo do esperado, os valores foram próximos aos encontrados por Oliveira et al. (1999) (vigor médio 2,5), porém inferiores aos encontrados por Silva et al. (2001), os quais relataram valores de 3,5 ± 0,5, utilizando a técnica *Two Steps*. Verifica-se desta forma, uma variação de resultados na literatura, podendo ocorrer devido às diferenças do sêmen fresco e à variação individual dos avaliadores.

Não foi verificada diferença significativa entre os valores de motilidade progressiva e nem do vigor do sêmen, criopreservado pelas técnicas *One Step* e *Two Steps*, o que está de

acordo com os achados de Peña et al. (1998).

As médias verificadas para porcentagem de espermatozóides vivos, no sêmen criopreservado pelas técnicas *One Step* e *Two Steps*, foram satisfatórias (acima de 50%), próximas às encontrados por Peña et al. (1998) (58,6% ± 9,2% e 44,3% ± 17,9%), que não observaram diferença significativa deste parâmetro entre os grupos estudados.

Em relação à porcentagem de membranas plasmáticas íntegras, foram observados resultados inferiores aos descritos por Bueno et al. (2002) e por Castro et al. (2007) que encontraram, respectivamente, 55,1% ± 12% e 46,87% ± 16,61% utilizando esta mesma técnica, porém em meios diluidores diferentes. Não houve, contudo, diferença significativa na porcentagem de membranas plasmáticas íntegras, entre os grupos G1 e G2. O tipo de meio e de crioprotetor, podem ter sido responsáveis pelas diferenças nos resultados da criopreservação, porém no estudo de Cardoso (2002) foi demonstrado que o diluidor à base de água de coco é eficaz na preservação da qualidade espermática, na congelação do sêmen canino. Neste contexto, diferenças na ação crioprotetora do sêmen de cães com o uso de glicerol e etilenoglicol, foi constatado por Castro et al. (2007).

O método *Two Steps* é utilizado para a preservação do sêmen de cães (Cardoso

et al., 2002; Cavalcanti et al., 2002), porém o método de *One Step* tem a vantagem de ser mais rápido e prático, e também demonstrou ser eficiente no congelamento do sêmen de cães. Silva et al. (2003) e Peña et al. (1998) não encontraram diferença entre os métodos utilizando como diluidor o meio Tris.

As técnicas *One Step* e *Two Steps* não influenciam a qualidade do sêmen congelado de cães, podendo ambas serem utilizadas na criopreservação do sêmen de cães, diluído em água de coco e utilizando etilenoglicol como crioprotetor.

## REFERÊNCIAS

AZEVEDO, D.M.M.R.; TONIOLLI, R. Avaliação *in vitro* do sêmen de caprinos do tipo racial Marota diluído em água de coco estabilizada com anyibióticos e leite desnatado adicionado de ácido 3-indolacética (IAA). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.24, n.4, p.187-193, 2000. [ Links ].

BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; VALENTIM, F.M. Qualidade espermática de sêmen canino criopreservado, quanto à utilização de dois meios diluidores e dois protocolos de resfriamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.196-199, 2002. [ Links ].

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W.U.; DIÓGENES, J.H.T.; GUERRA, F.F.A. A água de coco criopreservada proveniente de diferentes variedades e idades de maturação como diluidor de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.4, p.331-338, 2002. [ Links ].

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Efeito dos estágios do processo de congelação sobre a qualidade do sêmen canino diluído em solução à base de água de coco. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.1, p.26-31, 2002. [ Links ].

CASTRO, A.C.N.; PACHECO, A.; SILVA, D.B.; GODIM, D.S.; PINHO, T.G. Viabilidade do sêmen canino submetido à criopreservação com glicerol e etileno-glicol, **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.14, n.2, p.122-124, 2007. [ Links ].

CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S. GUERRA, M.M.P. Ação crioprotetora do glicerol e etilenoglicol no congelamento do sêmen de cão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.174-176, 2002. [ Links ].

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction and Science**, v.62, p.3-22, 2000. [ Links ].

INAMASSU, A.; UECHI, E.; LOPES, M.D. Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.302-304, 1999. [ Links ].

JEYENGRAN, R.S.; VAN DER VEM, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984. [ Links ].

OLAR, T.T.; BOEW, R.A.; PICKETT, B.W. Influence of extender, criopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v.31, n.2, p.451-461, 1989. [ Links ].

OLIVEIRA, J.V.L.; BARRETO, C.S.; FILHO, A.L.R. Avaliação de sêmen canino pós-descongelamento utilizando-se tris-gema e lactose-gema em quatro diferentes períodos de equilíbrio. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.308-309, 1999. [ Links ].

PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Effects of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v.50, n.1, p.163-174, 1998. [ Links ].

SILVA, L.D.M. Avanços da inseminação artificial na espécie canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.107-111, 2001. [ Links ].

SOUZA, F.F., LOPES, M.D.; BARRETO, S. Avaliação da integridade estrutural e funcional da membrana de espermatozoides de cães utilizando o teste hiposmótico e a coloração com sonda fluorescente. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.462-464, 2001. [ Links ].

THOMAS, P.G.A. A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v.40, n.6, p.1199-1205, 1993. [ Links ].

Data de recebimento: 04/09/2008

Data de aprovação: 27/05/2009