

## AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CRIOPROTETORES PERMEANTES E NÃO PERMEANTES NO DESCONGELAMENTO RÁPIDO E LENTO DO SÊMEN CANINO

AMANDA CARLA ACIPRESTE<sup>1</sup>, EDUARDO PAULINO COSTA<sup>2</sup>, FABRÍCIO ALBANI OLIVEIRA<sup>3</sup>, SANELY LOURENÇO COSTA<sup>4</sup>, TALITA FERNANDES SILVA<sup>5</sup>, DANIEL CORTES BERETTA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduanda da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil - amanda@milgran.com.br

<sup>2</sup>Professor Doutor da Universidade Federal de Viçosa Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Pós-Graduando da Universidade Federal de Viçosa Viçosa, MG, Brasil.

<sup>4</sup>Médica Veterinária, Mestre da Universidade Federal de Viçosa Viçosa, MG, Brasil.

<sup>5</sup>Pós-Graduanda da Universidade Federal de Viçosa Viçosa, MG, Brasil.

<sup>6</sup>Professor Doutor da Universidade de Rio Verde, Rio Verde GO, Brasil

### RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da associação entre crioprotetores ainda pouco estudados no Brasil como a dimetilformamida e a trealose em meio diluidor, por meio de protocolos de descongelamento rápido e lento. Foram utilizados três cães machos, adultos, sadios da raça Labrador do Retriever, que foram submetidos a uma coleta de sêmen semanal durante o período de cinco semanas. Os três meios diluentes utilizados neste estudo foram: (D1)-tris-citrato, acrescido de 3% de dimetilformamida + 3% de glicerol, (D2)-3% de dimetilformamida e de trealose e (D3)-4% de glicerol. No descongelamento, metade das amostras de cada meio diluente foi descongelada pelo método rápido, em banho-

maria a 75 °C por sete segundos, seguido de nova imersão a 37 °C por 1 minuto. A outra metade foi descongelada pelo método lento, em banho-maria à 37 °C por 1 minuto. O sêmen foi avaliado quanto à motilidade progressiva, vigor espermáticos e integridade de membrana. Para isso, as amostras foram submetidas aos testes hipo-osmótico e de integridade da membrana plasmática e do acrossoma (fluorescência). Os resultados indicam que o uso do glicerol como crioprotetor em diluidor TRIS proporciona maior eficácia na criopreservação dos espermatozoides da espécie canina, quando comparados com a dimetilformamida associada ao glicerol ou trealose.

**PALAVRAS-CHAVE:** cão; criopreservação; dimetilformamida; glicerol; trealose.

### EVALUATING THE EFFECTIVENESS OF PERMEATING AND NON-PERMEATING CRYOPROTECTANTS IN FAST AND SLOW DEFROSTING OF CANINE SEMEN

#### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the association between cryoprotectants little studied in Brazil such as dimethylformamide and trehalose amid thinner, using protocols of fast and slow defrosting. Three adult Labrador Retriever male, healthy dogs, weekly submitted to one semen collection during five-weeks period, were used. The base diluent medium used in this study was tris-citrate added with 3% of dimethylformamide + 3%

glycerol (D1), 3% dimethylformamide and trehalose (D2) and 4% glycerol (D3). At defrosting, half of the semen samples from each diluent medium was defrosted by rapid method in water-bath at 75 °C for seven minutes, followed by a new immersion at 37 °C for 1 minute. The other half of the samples was defrosted by slow method, in water-bath at 37 °C for 1 minute. The semen was evaluated for sperm progressive motility and vigor, besides membrane

integrity. For this, the semen samples were submitted to either hyposmotic and membrane integrity tests of the plasmatic membrane and acrosome (fluorescence). The results indicated that the use of glycerol as cryoprotector

in TRIS diluter provides greater efficacy in cryopreserving spermatozoa of the canine species, when compared to dimethylformamide associated with trehalose or glycerol.

KEYWORDS: cryopreservation; dimethylformamide; dogs; glycerol; trehalose.

## INTRODUÇÃO

A utilização de diversos crioprotetores e suas combinações visa minimizar os processos deletérios que ocorrem na célula espermática durante o processo de congelamento e descongelamento (1), possibilitando melhores taxas de prenhez (2).

Os diluidores utilizados para o sêmen canino foram adaptados de outras espécies, sendo inicialmente empregados meios à base de leite desnatado, lactose-gema, citrato-gema e tris-gema (3). Pesquisas recentes estão utilizando diluidores à base de água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>) (4,5) e tris e/ou citrato de sódio, acrescido de gema de ovo, açúcares (glicose, frutose, xilose ou trealose) e diferentes agentes crioprotetores (6).

Os principais crioprotetores permeantes investigados para a criopreservação do sêmen das diversas espécies domésticas são o glicerol, o etilenoglicol e a dimetilformamida (3, 7). Entretanto, ainda existem poucos estudos que comprovem a concentração e as combinações adequadas dessas substâncias na criopreservação do sêmen canino. Apesar do efeito protetor, o glicerol é tóxico e sua concentração no meio diluidor deve estar entre a mínima necessária para promover proteção e a máxima permitida para não causar danos aos espermatozoides (8).

Outro fator de grande importância é o protocolo de descongelamento do sêmen (10). Estudos comparando a influência da temperatura e o tempo de descongelamento sobre a qualidade espermática mostrou que a temperatura mais elevada associada ao menor tempo de descongelamento promove adequada qualidade pós-descongelamento (2, 9).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da associação entre crioprotetores ainda pouco estudados no Brasil como a dimetilformamida e a trealose em meio diluidor, utilizando-se protocolos de descongelamento rápido e lento.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa.

Foram utilizados três cães da raça Labrador Retriever, clinicamente saudáveis, com idade entre dois e quatro anos. Durante todo o período experimental, foi mantido o mesmo manejo alimentar para todos os animais, com ração comercial disponível uma vez ao dia e água *ad libitum*.

Os cães foram previamente submetidos ao exame andrológico completo e apresentaram parâmetros de normalidade de acordo com o CBRA (11). As coletas de sêmen foram realizadas em intervalos semanais, com uma coleta por semana, totalizando cinco coletas para cada macho. Para a obtenção do sêmen, adotou-se o método de manipulação digital do bulbo peniano sendo coletada as três frações do ejaculado. Foram utilizados tubos graduados acoplados a funis de plástico, ambos acondicionados em isopor com água a 37 °C. Imediatamente após a coleta, o ejaculado foi incubado a 37 °C em banho-maria. Em seguida, foram registrados o volume, a concentração espermática, a motilidade progressiva e o vigor espermáticos.

A avaliação de motilidade e vigor foi realizada em microscópio óptico, em aumento de 200x. A mensuração da concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se 20 µL de sêmen em 4,0 mL de solução salina formolizada (12). O número total de espermatozoides foi obtido multiplicando-se o volume de sêmen ejaculado pela concentração espermática, ambos em mL. As análises morfológicas foram efetuadas em câmara úmida, sendo avaliadas 200 células por amostra (13), em contraste de fase, sob aumento de 1000x.

Após a avaliação andrológica, o sêmen obtido de cada ejaculado foi dividido em três frações iguais, sendo cada uma delas pré-diluída na proporção 1:1 (sêmen:diluidor), com solução de Ringer Lactato<sup>®</sup> a 37 °C. Em seguida, o sêmen foi

centrifugado a 650 G por 10 minutos para a retirada do líquido seminal e padronização das amostras. O sobrenadante de cada amostra foi ressuspensionado com um dos diluentes a serem testados, todos à base de tris-citrato (14).

Após a centrifugação e retirada do líquido sobrenadante, as amostras de sêmen foram diluídas em três diferentes meios (D1, D2 e D3), todos à base de tris-citrato (Tabela 1).

Tabela 1: Composição do meio tris-citrato, utilizado como diluente base do sêmen, nos diferentes tratamentos (T1, T2, e T3)

Diluidor	T1	T2	T3
Tris (g)	3,025	3,025	3,025
Ácido Cítrico (g)	1,70	1,70	1,70
Frutose (g)	1,25	1,25	1,25
Gema de ovo %	20	20	20
Estreptomina (mg/l)	1	1	1
Glicerol (mL)	3	-	5
Dimetil-formamida (mL)	3	3	-
Trealose (g)	-	3	-
Água Destilada - qsp (mL)	100	100	100

g=gramas

%= porcentagem

mg/l= miligramas por litro

mL= mililitros

O diluente 1 (D1) consistiu na diluição em tris-citrato, utilizando-se como crioprotetores 3% de dimetilformamida + 3% de glicerol; o diluente 2 (D2), em Tris-citrato acrescido de 3% de dimetilformamida e de trealose; o diluente 3 (D3), em Tris-citrato, acrescido de 4% de glicerol. O volume acrescentado de diluidor foi suficiente para o ajuste da concentração total de 25 milhões de espermatozoides por 0,5 mL, volume este correspondente às palhetas para o envase, as quais foram previamente identificadas e lacradas com álcool polivinílico.

As palhetas foram submetidas ao protocolo de resfriamento, sendo colocadas em um frasco de vidro pré-aquecido, medindo 15 centímetros de altura e 5 cm de diâmetro, o qual foi sistematicamente fechado. Esse frasco foi colocado dentro de um recipiente de plástico, com 20 cm de altura e 12 cm de diâmetro, contendo 1250 mL de água a 37 °C. Ambos os recipientes, foram acoplados em local específico dentro de uma caixa de isopor com as seguintes dimensões: 32,5 cm de altura, 2,0 cm de espessura e 30,0 cm de largura. Essa caixa foi previamente preparada com 4,0 litros de gelo e 4,0 litros de água, volume pré-definido para se atingir, de modo aproximado, a curva de resfriamento em cerca de 60 minutos, com temperatura inicial de 37 °C, até atingir a temperatura final de 4 °C. Foi utilizado termômetro digital para aferição da temperatura, o

que permitiu a definição aproximada da curva de resfriamento do sêmen, -0,45°C/min; entretanto, essa queda não foi contínua, durante os 60 minutos do resfriamento (15).

Na sequência ocorreu o período de equilíbrio das amostras, que foram mantidas por mais 60 minutos à aproximadamente 4°C, na mesma caixa de isopor (15).

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas, que estavam em equilíbrio a 4°C, sobre uma grade de isopor a 4 cm do nível de nitrogênio líquido durante 15 minutos. Após esse período, foram mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido e acondicionadas em botijão até o momento de sua utilização.

No descongelamento do sêmen foram utilizados dois protocolos: descongelamento rápido e lento. A metade das amostras de sêmen congeladas com cada um dos diluentes utilizados foi descongelada pelo método rápido e a outra metade pelo lento. Dessa forma, foram comparados seis tratamentos: descongelamento rápido (T1, T2 e T3, para o sêmen diluído com os diluentes D1, D2 e D3, respectivamente) e lento (T4, T5 e T6, para o sêmen diluído com os diluentes D1, D2 e D3, respectivamente).

O descongelamento rápido foi realizado em banho-maria a 75 °C por sete segundos, seguido de nova imersão a 37 °C por 1 minuto

(16), enquanto que o processo lento foi realizado em banho-maria à 37 °C por 1 minuto (17).

Quando os métodos *in vitro* são usados em conjunto, aumenta-se a acurácia em predizer o potencial de fertilidade do sêmen criopreservado. Para tal, o sêmen deve ser submetido a alguns testes específicos que avaliam, entre outras características, os seus parâmetros físicos, integridade da membrana plasmática e do acrossoma e a longevidade dos espermatozoides (18). Dessa forma, após a descongelação, as amostras de sêmen foram submetidas à avaliação de motilidade e vigor, teste de termoresistência (TTR), teste hiposmótico e coloração por fluorescência.

A longevidade dos espermatozoides foi avaliada por meio do TTR. O teste consistiu na incubação de 0,5 mL da amostra a 37 °C durante 2 horas, sendo avaliadas a cada 30 minutos quanto à motilidade e vigor espermáticos (19).

Para o teste hiposmótico, 500 µl de uma solução com frutose na concentração de 60 mOsm/kg foi acrescida de 50 µl de sêmen. Após a incubação por 30 minutos em banho-maria a 37 °C, as amostras foram fixadas em 250 µl de solução de formol salina tamponada, para posterior análise em microscopia de contraste de fase. Foi avaliada a integridade da membrana plasmática por meio da contagem de 200 células em aumento de 1000x, sendo os espermatozoides que apresentavam sua cauda enrolada considerados com a membrana espermática funcional.

A integridade estrutural da membrana plasmática e do acrossoma foi avaliada pela técnica de fluorescência, adotando-se a coloração com dois fluorocromos (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio), segundo protocolo de Harrison & Vickers (20), com as modificações propostas por Zúccari (21). O

volume total foi fracionado em alíquotas, acondicionado em *Eppendorfs* e mantido congelado a -20 °C. As soluções de formol, citrato de sódio e os fluorocromos usadas para a realização do teste de fluorescência direta foram preparadas e armazenadas sob refrigeração a 5 °C, sendo mantidas em temperatura ambiente no dia da avaliação do sêmen. Foram analisadas 100 células por amostra com aumento de 400x em microscópio de fluorescência com utilização de filtros de 480 a 610 nm. De acordo com a coloração, os espermatozoides foram classificados em íntegros, semi-lesados e lesados.

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran) e, posteriormente, à análise de variância. Apresentando significância, foi realizado o teste de Scott-Knott ou Duncan. A variável qualitativa “vigor” foi submetida ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, adotando-se o nível de significância de 1% (22).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação às características físicas e morfológicas do sêmen fresco, observou-se que todos os resultados estavam dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie estudada (23, 24).

Assim, verificou-se que os sêmens diluídos em meios contendo glicerol apresentaram maior motilidade progressiva e vigor espermáticos ao serem descongelados, independente do método de descongelação (T1 e T4; T3 e T6, para o sêmen diluído no meio D1 e D3, respectivamente). Diante disto, é provável que esse efeito positivo tenha sido pelo glicerol, uma vez que esse crioprotetor estava presente nos dois diluentes (Tabela 2).

Tabela 2 - Motilidade progressiva (%) de sêmen canino congelado com diferentes associações de crioprotetores e submetido ao TTR após o descongelamento

Tratamento	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
T1	70,7 ± 12,6 <sup>a</sup>	43,3 ± 16,7 <sup>a</sup>	22,0 ± 7,3 <sup>a</sup>	10,0 ± 5,0 <sup>b</sup>	2,0 ± 4,1 <sup>b</sup>
T2	34,3 ± 11,2 <sup>b</sup>	21,3 ± 11,8 <sup>b</sup>	12,3 ± 3,7 <sup>b</sup>	5,0 ± 5,0 <sup>c</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
T3	67,3 ± 14,3 <sup>a</sup>	45,0 ± 14,4 <sup>a</sup>	25,0 ± 9,0 <sup>a</sup>	14,0 ± 5,4 <sup>a</sup>	8,3 ± 5,2 <sup>a</sup>
T4	65,0 ± 12,1 <sup>a</sup>	42,7 ± 18,5 <sup>a</sup>	21,0 ± 8,3 <sup>a</sup>	12,7 ± 2,6 <sup>a,b</sup>	3,0 ± 5,3 <sup>b</sup>
T5	29,0 ± 9,9 <sup>b</sup>	18,0 ± 3,7 <sup>b</sup>	10,0 ± 3,8 <sup>b</sup>	1,3 ± 3,5 <sup>d</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
T6	64,7 ± 16,1 <sup>a</sup>	45,0 ± 20,7 <sup>a</sup>	20,3 ± 9,0 <sup>a</sup>	10,3 ± 5,8 <sup>b</sup>	1,7 ± 4,5 <sup>b</sup>

Min. = Minutos de TTR; M = Média; DP = Desvio Padrão.

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,01) pelo teste de Duncan.

Descongelamento rápido: T1, T2 e T3, para o sêmen diluído com os diluentes D1, D2 e D3, respectivamente.

Descongelamento lento: T4, T5 e T6, para o sêmen diluído com os diluentes D1, D2 e D3, respectivamente.

O diluente D2 (T2 e T5) apresentou resultados inferiores com relação à motilidade progressiva e vigor espermático após o descongelamento. Esses resultados demonstram que a associação de dimetilformamida com trealose não foi benéfica na preservação da integridade dos espermatozoides. Também Bordignon et al. (25) não obtiveram bons resultados na criopreservação do sêmen suíno, utilizando a associação da trealose com glicerol. Entretanto, ao associar a trealose com acetamida, Snoeck et al. (26) observaram efeito positivo dessa associação para criopreservar sêmen de equino. Esses pesquisadores verificaram que a associação permitiu resultados semelhantes aos observados com diluente à base de glicerol, quanto à taxa de motilidade progressiva após o descongelamento.

A concentração utilizada do crioprotetor dimetilformamida no presente experimento foi baseada em experimentos realizados com sêmen de animais de outras espécies, em que a dimetilformamida teve efeitos positivos, como em sêmen da espécie equina, quando associada ao glicerol (27). Entretanto, neste estudo, essa associação não apresentou efeitos benéficos na taxa de motilidade progressiva e vigor espermático (D1 = T1 e T4), quando comparado como meio em que foi utilizado somente o glicerol como crioprotetor (D3 = T3 e T6). Essa condição também foi observada em sêmen da espécie caprina (6). Esses resultados estão em contraposição aos encontrados por Zimmermann et al. (10), os quais relatam que tanto a dimetilformamida a 7%, como o glicerol a 6%, associados ao meio tris-gema, possuem capacidade de preservar a qualidade do sêmen canino; no entanto, o uso de dimetilformamida na concentração de 3,5% não apresentou resultados satisfatórios. Diante disso, é provável que a ausência de efeitos positivos da dimetilformamida associada ao glicerol (D1 = T1 e T4) quando comparada ao uso somente do glicerol (D3 = T3 e T6) tenha ocorrido devido à baixa concentração utilizada (3%), próxima à testada (3,5) por Zimmermann et al. (10). Isso demonstra que a associação da dimetilformamida com o glicerol pode ser benéfica ou não na preservação da integridade espermática, dependendo da espécie animal, fato observado no presente experimento com sêmen de cães. Isso ocorrer provavelmente devido às diferentes composições de membrana espermática entre as espécies animais.

Quanto ao TTR, verificou-se que o sêmen diluído em TRIS acrescido de trealose e dimetilformamida também apresentou maior

comprometimento da motilidade progressiva após 60 minutos de incubação (D2 = T2 e T5), enquanto que o sêmen diluído em meio contendo glicerol, associado ou não com dimetilformamida, apresentou melhores resultados (D1 = T1 e T4 e D3 = T3 e T6).

Adicionalmente, verificou-se a superioridade do glicerol na preservação da integridade espermática, tendo em vista que, no final do TTR (120 minutos de incubação), os resultados tanto de motilidade espermática quanto de vigor foram superiores ( $P < 0,01$ ) quando somente o glicerol estava presente como crioprotetor (Tabelas 2 e 3). É provável que a concentração de glicerol utilizada no presente experimento (4%) tenha favorecido os resultados encontrados, tendo em vista que, de acordo com England & Allen (28), a concentração de glicerol utilizada para o congelamento do sêmen de cães varia de 4 a 11%, sendo que a sua concentração ótima em um meio diluente representa o equilíbrio entre o efeito protetor e o efeito tóxico do mesmo (29).

Entretanto, vale ressaltar que o protocolo de descongelamento utilizado (rápido) foi um aspecto determinante na ocorrência dos melhores resultados, tendo em vista que esse efeito benéfico não foi observado quando o sêmen foi descongelado pelo método lento. O descongelamento rápido reduz a formação de cristais de gelo intracelular e permite à diminuição do estresse da célula espermática (30). Por outro lado, o descongelamento lento expõe a célula espermática a maiores oscilações de temperatura, proporcionando um aumento na deposição lipídica e proteica, influenciando diretamente na estrutura física da célula, diminuindo, dessa maneira, a viabilidade espermática (9).

Os resultados do teste hiposmótico (Tabela 4) demonstraram que as associações de crioprotetores testados apresentaram adequado percentual de espermatozoides com cauda enrolada, estando condizentes aos valores encontrados na literatura, que variam entre 40 a 60%, considerando a espécie humana, equina e canina (31, 32).

Foi observada correlação positiva no que diz respeito às alterações acrossomais avaliadas na microscopia de contraste de fase e percentagem de espermatozoides lesados visualizados na fluorescência ( $r = 0,86$ ) ( $P < 0,01$ ). Dessa maneira, os resultados apresentados pelo teste de fluorescência e de teste hiposmótico demonstraram alto índice de fidedignidade. Neild et al. (31) também observaram correlação positiva ( $r = 0,67$ ) ( $P < 0,01$ ) entre o teste de teste hiposmótico e o teste de coloração por sonda fluorescente, sendo estatisticamente iguais às

médias encontradas para os dois testes.

Tabela 3 - Vigor espermático (%) de sêmen canino congelado com diferentes associações de crioprotetores e submetido ao TTR após o descongelamento

Tratamento	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
T1	2,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,5 <sup>b</sup>
T2	2,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,3 <sup>a,c</sup>	0,5 ± 0,5 <sup>a,b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
T3	3,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,4 <sup>a,d</sup>	1,3 ± 0,4 <sup>a,c</sup>	0,8 ± 0,5 <sup>a</sup>
T4	2,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>a,d</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
T5	2,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>b,c</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
T6	2,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,5 <sup>a,c</sup>	1,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,4 <sup>b</sup>

Min. = Minutos de TTR; M = Média; DP = Desvio Padrão.

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,01) teste de Kruskal-Wallis.

Descongelamento rápido: T1, T2 e T3, para o sêmen diluído com os diluentes D1, D2 e D3, respectivamente.

Descongelamento lento: T4, T5 e T6, para o sêmen diluído com os diluentes D1, D2 e D3, respectivamente.

Tabela 4 – Valores percentuais do teste hiposmótico e teste de fluorescência de membrana e acrossoma em amostras de sêmen de cães submetidos à criopreservação com diferentes associações de crioprotetores

Tratamentos	Hiposmótico (%)	Fluorescência de membrana e acrossoma
	M ± DP	M ± DP
T1	60,1 ± 14,2 <sup>b</sup>	52,5 ± 12,3 <sup>b</sup>
T2	52,7 ± 7,4 <sup>b</sup>	48,3 ± 6,8 <sup>b</sup>
T3	68,4 ± 10,1 <sup>a</sup>	64,2 ± 9,6 <sup>a</sup>
T4	57,4 ± 10,4 <sup>b</sup>	53,9 ± 10,5 <sup>b</sup>
T5	54,7 ± 7,0 <sup>b</sup>	53,5 ± 6,1 <sup>b</sup>
T6	60,3 ± 9,4 <sup>b</sup>	56,9 ± 7,5 <sup>b</sup>

M = Média; DP = Desvio padrão

<sup>a,b</sup> letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,01) teste de Scott-Knott.

Descongelamento rápido: T1, T2 e T3, para o sêmen diluído com os diluentes D1, D2 e D3, respectivamente.

Descongelamento lento: T4, T5 e T6, para o sêmen diluído com os diluentes D1, D2 e D3, respectivamente.

Confirmando os resultados de motilidade e vigor espermáticos (Tabelas 2 e 3), foi observado que o uso somente do glicerol como crioprotetor preservou melhor (P<0,01, Tabela 4) as membranas espermáticas e acrossomais dos espermatozóides (T3). O percentual mais elevado de membranas íntegras encontrado em sêmen deste tratamento (T3) ressalta a ação crioprotetora do glicerol no meio diluente, que resultou na proteção e estabilidade da membrana espermática criopreservada (29). A proteína de canais de água denominada Aquaporina 7 (AQP7) tem como função o transporte de glicerol (33). Em cães, a AQP7 já foi detectada no epitélio da região proximal do epidídimo e nos vasos deferentes (34). A presença de AQP7 na membrana plasmática pode explicar as diferenças de permeabilidade ao glicerol nas células espermáticas entre as diferentes espécies (35).

Já as associações de 3% de dimetilformamida e glicerol (D1) e 3% de dimetilformamida e trealose (D2) apresentaram

inferioridade quanto ao percentual de células com relação à integridade de membranas. Esses resultados indicam que não foi demonstrada eficiência deste agente crioprotetor quando associado ao glicerol ou à trealose. Esta condição também foi verificada por Forero-Gonzalez (36), avaliando a integridade de membrana plasmática e do acrossoma, mediante a utilização da dimetilformamida em meio diluente tris na espécie bovina. Provavelmente, a dimetilformamida, quando associada a outro agente crioprotetor, como o glicerol e a trealose, promova reações que potencializem seu efeito. Com isto, a toxicidade à célula espermática é aumentada, fato responsável pelas lesões evidenciadas quanto à integridade funcional da membrana celular.

Não houve uma interação sobre as duas variáveis estudadas, ou seja, no uso de crioprotetores associados aos protocolos de descongelamento rápido e lento, sendo encontrados resultados de correlação (P>0,05).

## CONCLUSÕES

O uso do glicerol como crioprotetor em diluidor TRIS associado ao método de descongelamento rápida proporcionou maior eficácia na preservação dos espermatozoides da espécie canina, quando comparados com a dimetilformamida associada ao glicerol ou trealose.

## REFERÊNCIAS

- Rossi T.C., Papa F.O., Santos T.B., Macedo L.P., Alvarenga M.A., Melo C.M., Dell'Aqua Junior J.A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2003; 27:350-352.
- Madeira V.L.H., Monteiro C.L.B., Barbosa C.C. Efeito de diferentes protocolos de descongelamento sobre o sêmen canino criopreservado em diluidor à base água de coco em pó (ACP-106®). *Ciência Animal Brasileira*, 2010;11(4):845-852.
- Farstad W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, 1996;42:251-260.
- Barros T.B. Toniolli R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2011;35:400-407.
- Cardoso J.F.S., Paula N.R.O., Uchoa D.C., Silva, L.D.M. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. *Comunicata Scientiae*, 2010; 2:146-152.
- Silva A.F., Costa E.P., Oliveira F.A. Uso da dimetilformamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2006; 35:452-456.
- Watson P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 1995;7:871-891.
- Cotorello ACP, Henry M Princípios da criopreservação, congelamento e avaliação do sêmen equino (Revisão de Literatura). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2002; 26(1):14-25.
- Peña A., Linde-Forsberg C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 2000;54(6):859-875.
- Zimmermann, M., Santos, T.E., Fidelis, A.A.G., Blume, H., Mondadori, R.G. Uso de dimetil-formamida e água de coco na criopreservação de sêmen canino. *Bioscience Journal*, 2007; 23:96-100.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- Português
- Hancock K.L. The morphology of boar spermatozoa. *Journal Reproduction Microscopy Social*, 1957; 76:84-97.
- Blom, E. Pathological conditions in the genital organs and in the semen of group for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark, Nordisk. *Veterinaer Medicin*, ;35:105-130.
- Rota A., Strom B., Linde-Forsberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 1995; 44: 885-900.
- Bueno R. Qualidade espermática do sêmen canino criopreservado. II Utilização de dois protocolos de resfriamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2001;53(3): 372-379.
- Peña A.I., Barrio F., Quintela L.A. Effect of glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevit and acrossomal integrity. *Theriogenology*, 1998;50:163-174.
- Silva A. R., Cardoso R. C.S., Silva L.D.M. Efeito do processo de descongelamento sobre a viabilidade do sêmen canino in vitro. *Ciência Animal*, 1998;8:75-80.
- Larsson B., Rodriguez-Martínez H. Can we use in vitro fertilization testes to predict semen fertility. *Animal Reproduction Science*, 2000;60-61:327-336.
- Dimitropoulos R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondante du sperme congelé. *Annuaire Médecine Vétérinaire*, 1967;4:215-224.
- Harrison R.A.P., Vickers C.E. Use of fluorescent probes to access membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1990;88:343-352.
- Zúccari C.E.S.N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 121p. Português
- SAEG. SAEG: sistema para análises estatísticas. Versão 9.1. Viçosa: UFV, 2007
- Johnston S.D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 1991;21:545-551.
- Linde-Forsberg C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extend semen. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 1991;v.21:467-485.
- Bordignon V., Deschamps J.C., Sechin A. Efeito da trealose sobre a motilidade, acrossoma e fertilidade do sêmen congelado de suínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 1996;20:54-62.
- Snoeck P.P.N., Henry M., Santos L.M.G. Avaliação de crioprotetores no congelamento de sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*,

2001;25(3):454-455.

27. Medeiros A.S.L., Gomes G.M., Carmo M.T. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 2002;58:273-276.

28. England G.C.W., Allen W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. *Theriogenology*, 1992;37:373-381.

29. Watson P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1981;62:483-492.

30. Sodesquist L., Madrid-Bury N., Rodriguez-Martinez H. Assesment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*, 1997;48:1115-1125.

31. Neild D., Chaves G., Flores M. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 1999;51:721-727.

32. Kumi-Diaka J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 1993;39:1279-1289.

33. Curry M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, 2000;5:46-52.

34. Domeniconi R.F., Orsi A.M., Justulin J.R. Leme Beu C.C., Felisbino S.L. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. *Cell and Tissue Research*, 2008;332:329-335.

35. Okuda Y., Seita Y., Hisamatsu S., Sonoki S., Shino M., Masaoka T., Inomata T., Kamijo S., Kashiwazaki N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese White Rabbit. *Experimental Animals*, 2007;56:29-34.

36. Forero-Gonzalez RA, Celeghini ECC, Raphael FC, Andrade, AF, Bressan FF, Arruda RP. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, 2012;44:154-159.

---

Protocolado em: 26 ago. 2013 Aceito em 12 nov. 2013