

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO COM UM DILUIDOR À BASE DE ÁGUA DE COCO NA FORMA DE PÓ (ACP-106®): EFEITO DA TEMPERATURA DE ADIÇÃO DO GLICEROL (27 E 4°C)

CLAUDIA DA CUNHA BARBOSA,¹ VICTOR LEÃO HITZSCHKY MADEIRA,² RICARDO PARENTE JUCÁ,³ ÂNGELA CRISTINA DE OLIVEIRA,⁴ DANIEL COUTO UCHOA⁵ E LÚCIA DANIEL MACHADO DA SILVA⁶

-
1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE
 2. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE
 3. Acadêmico de Medicina Veterinária da UECE
 4. Acadêmica de Medicina Veterinária da UECE
 5. Doutorando da Rede Nordeste de Biotecnologia
 6. Departamento de Medicina Veterinária. Área: Reprodução de Carnívoros. E-mail: lucia.daniel.machado@hotmail.com.

RESUMO

Objetivou-se comparar o efeito da temperatura de adição do glicerol sobre o sêmen canino diluído em água de coco na forma de pó (ACP-106®) e criopreservado. Coletaram-se doze ejaculados, para avaliação da fração espermática, dividida em duas alíquotas. A primeira foi diluída em ACP-106® com 5% de gema de ovo e 6% de glicerol a 27°C (G27) e a segunda em ACP-106® com 5% de gema de ovo, com a glicerolização a 4°C (G4). As amostras foram congeladas, posteriormente, descongeladas e submetidas às avaliações de morfologia, integridade acrossomal, teste hypo-osmótico e percentual de vivos. Não se observou diferença entre as temperaturas de adição do glicerol em

todos os parâmetros. Na análise computadorizada, também não se evidenciou diferença entre os grupos na motilidade total e progressiva, percentual de espermatozoides com velocidade rápida e média, e velocidade média da trajetória (VAP) dos espermatozoides com velocidade rápida e média, sendo observadas, em G4 e G27, respectivamente, uma motilidade total de $24,45 \pm 3,93\%$ e $31,65 \pm 3,87\%$ e VAP dos espermatozoides rápidos de $91,24 \pm 7,74\mu\text{m/s}$ e $106,25 \pm 3,94\mu\text{m/s}$. Conclui-se que a temperatura de adição do glicerol não influencia a qualidade pós-descongelação do sêmen canino diluído em ACP-106®.

PALAVRAS-CHAVES: ACP-106®, cão, criopreservação, glicerol, sêmen.

ABSTRACT

CRYOPRESERVATION CANINE SEMEN USING A POWDERED COCONUT WATER EXTENDER (ACP-106): EFFECT OF GLYCEROL TEMPERATURE ADDITION (27°C AND 4°C)

The aim of the present study was to compare the effect of glycerol addition at two temperatures on canine semen extended and frozen with powdered coconut water extender (ACP-106®). Twelve ejaculates were collected, the sperm-rich fraction was evaluated and further divided into two aliquots. The first aliquot was extended in ACP-106® with 5% egg yolk and glycerol at 27°C (G27) and the second one was also extended in ACP-106® with 5% egg yolk, with glycerol addition at 4°C (G4). Samples were frozen, thawed

and submitted to evaluations of morphology, acrosomal integrity, hypo-osmotic swelling and alive spermatozoa. No differences were observed between groups after thawing regarding all seminal parameters. In computerized analyzes, it was also not evidenced differences between groups for total and progressive motility, percentual of spermatozoa with fast and medium velocity, and average path velocity (VAP) of spermatozoa with fast and medium velocity, being observed in G4 and G27, respectively, a total motility of

24.45 ± 3.87% and 31.65 ± 3.93% with the VAP of the fast spermatozoa of 91.24 ± 7.74 μm/s and 106.25 ± 3.94 μm/s. In conclusion, the glycerol temperature addition does not

influence the quality of post-thawed canine semen diluted in ACP-106®.

KEY WORDS: ACP-106®, cryopreservation, dog, glycerol, semen.

INTRODUÇÃO

Um componente de vital importância no diluidor para criopreservação de sêmen é o agente crioprotetor (OLIVEIRA, 2003), sendo o glicerol o mais utilizado em várias espécies (VIDAMENT et al., 2000; GIL et al., 2003), inclusive no cão (SILVA et al., 2003).

O glicerol pertence ao grupo dos crioprotetores intracelulares. Ao penetrar na célula, promove sua desidratação mediante a saída de água por osmose, evitando, assim, a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (MEDEIROS et al., 2002). Sua ação protetora é atribuída a suas propriedades coligativas e ligantes com a água, diminuindo o ponto crioscópico intracelular e a concentração intracelular de solutos, reduzindo, assim, os danos do efeito de solução (HOLT, 2000).

Fatores como a concentração (PEÑA et al., 1998) e forma de adição do glicerol (SILVA et al., 2003) podem influenciar a criopreservação do sêmen. Segundo PEÑA et al. (1998), a concentração ótima de glicerol varia de acordo com o diluidor, o método de congelação e a espécie animal. CARDOSO et al. (2003a), utilizando o diluidor à base de água de coco, demonstraram que as concentrações de 4%, 6% e 8% de glicerol poderiam ser utilizadas para a criopreservação do sêmen canino.

A temperatura de adição do glicerol gera controvérsias e vem sendo revisada em várias espécies como ovinos (GIL et al., 2003), equinos (VIDAMENT et al., 2000) e caninos (PEÑA et al., 1998). Para o sêmen canino, alguns autores realizam a adição do glicerol com temperaturas a 32°C (YILDIZ et al., 2000), 35°C (NÖTHLING & SHUTTLEWORTH, 2005), temperatura ambiente (ROTA et al., 1996) e ainda a 4°C (CARDOSO et al., 2005). SILVA et al. (2005) não encontraram diferenças entre a adição de glicerol ao sêmen canino

a 27° ou a 4°C, utilizando o diluidor TRIS-gema, e ANDERSEN (1975) notificou a adição de um diluidor glicerolizado ao sêmen a 37°C e obteve bons resultados após a inseminação artificial.

Tendo em vista o grande número de trabalhos utilizando variadas temperaturas de glicerolização, sem interferência na qualidade espermática, e dada a carência de estudos sobre a temperatura de adição do glicerol ao diluidor ACP-106® para a criopreservação de sêmen canino, este trabalho teve como objetivo comparar o efeito da adição do glicerol a 27°C e 4°C sobre o sêmen canino diluído em ACP-106® e criopreservado, utilizando os parâmetros de motilidade pós-descongelação, morfologia, integridade acrossomal, percentual de espermatozoides vivos, teste de termorresistência e hipo-osmótico.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Selecionaram-se seis cães, oriundos de canis particulares, sendo dois da raça Boxer, dois Rottweiler, um American Pit Bull Terrier e um Bullmastiff, com idade entre dezoito meses e nove anos. Os cães foram mantidos em canis individuais com livre acesso à água e alimentados uma vez ao dia com ração comercial.

Coleta e avaliação de sêmen

Utilizou-se um total de doze ejaculados, sendo seis obtidos da raça Boxer, quatro da raça Rottwiler, um da raça American Pit Bull Terrier e um da raça Bullmastiff. A coleta foi realizada através da técnica de manipulação digital (CHRISTIANSEN, 1988), utilizando-se tubos de vidro graduados acoplados a um funil, sendo as frações seminais separadas por mudança na coloração. Destinou-se a fração rica em espermatozoides

a avaliações e a posterior criopreservação. No sêmen a fresco, foram observados os parâmetros macroscópicos de cor e volume. Os parâmetros microscópicos de motilidade (percentual de espermatozoides com motilidade progressiva e retilínea) e vigor espermático, mensurado em uma escala de 0 (ausência de movimento) a 5 (movimento vigoroso, retilíneo e progressivo; CBRA, 1998), foram avaliados com auxílio de microscópio óptico (100x).

Procedeu-se à avaliação da morfologia espermática e da integridade acrossomal por meio da contagem de duzentas células em esfregaço úmido corado com rosa de bengala. Para preparação do esfregaço, 5,0 μL de sêmen foram condicionados em microtubo Eppendorf® contendo 75,0 μL do corante rosa de bengala, sendo a amostra homogeneizada e colocados 5,0 μL dessa mistura sob uma lâmina e colada uma lamínula sobre essa gota. Classificaram-se as células como normal ou apresentando alterações primárias ou secundárias e separando-as de acordo com a sua localização (cabeça, peça intermediária e cauda) (CARDOSO, 2005). Classificou-se o acrossoma como intacto ou danificado. Essas avaliações foram realizadas em microscopia óptica, em aumento de mil vezes.

Mensurou-se a concentração espermática por meio de contagem em câmara de Neubauer (CARDOSO et al., 2003b).

Somente amostras apresentando motilidade $\geq 85\%$, vigor ≥ 4 e alterações morfológicas totais espermáticas $\leq 15\%$ foram utilizadas para o experimento.

Processamento do sêmen

A água de coco na forma de pó (ACP-106®, ACPBIOTECNOLOGIA®, Fortaleza-Ceará, Brasil) foi utilizado como diluidor-base, preparado segundo recomendações do fabricante com um pH de 7,07 e osmolaridade de 298mOsmol. A esse diluidor foi acrescida gema de ovo, com uma concentração final de 5%. Dividiu-se o diluidor com a gema de ovo em duas partes (A e B).

A parte “A” foi composta por ACP-106® + gema de ovo e a Parte “B”, similar à anterior,

entretanto acrescida de glicerol em uma concentração final de 12%.

Após a avaliação de motilidade, vigor e concentração espermática do sêmen, este foi dividido em duas alíquotas e destinado a dois grupos experimentais: grupo 27 e grupo 4.

O grupo 27 foi diluído de forma única, à temperatura de 27°C, com as frações A e B do diluidor ACP-106®, o qual apresentava em sua constituição final 5% de gema de ovo e 6% de glicerol. Ao final da diluição a amostra apresentou uma concentração de 200 x 10⁶ espermatozoides/mL. Foi realizada ainda, à temperatura de 27°C, a primeira diluição do grupo 4, sendo este diluído de forma única somente com o diluidor A. Após essa primeira diluição, procedeu-se a uma avaliação subjetiva de motilidade e vigor em ambas as amostras, sendo então ambos os grupos armazenados em tubos de vidro colocados em um recipiente com água e acondicionados em caixa térmica com gelo reciclável (15°C) por quarenta minutos. Em seguida, os grupos foram transferidos para um refrigerador até atingir 4°C (trinta minutos).

A segunda diluição foi realizada somente no G4, diluindo-o de forma única com o diluidor B, sendo o glicerol adicionado a essa amostra à temperatura de 4°C. Ao final da segunda diluição, obteve-se uma concentração final de 200 x 10⁶ espermatozoides/mL. Após quinze minutos da segunda diluição, o sêmen foi novamente avaliado quanto à motilidade e vigor de forma subjetiva, em ambos os grupos, sendo o sêmen então envasado em palhetas de 0,25 mL, e as palhetas dispostas horizontalmente em rampa de congelação a uma altura de 5 cm do nível de nitrogênio líquido por cinco minutos, e finalmente, armazenadas em nitrogênio líquido.

Teste de termorresistência e análise da motilidade espermática auxiliada por computador

Após uma semana, o sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por um minuto, depositado em um tubo Eppendorf® e destinado ao teste de termorresistência. Neste teste, o sêmen foi mantido em banho-maria a 37°C, sendo avaliado

imediatamente e trinta, sessenta e noventa minutos após a descongelação, a fim de se verificar a termorresistência espermática (SILVA et al., 2003).

Após a descongelação e com sessenta minutos de incubação em banho-maria, foi realizada a avaliação do percentual de espermatozoides vivos, por meio de esfregaços de sêmen corados com azul de bromofenol, sendo 5,0 µl de sêmen colocados sob uma lâmina de vidro e sob essa gota colocados 5,0 µL do corante azul de bromofenol. Essa gota, então, foi homogeneizada e realizado um esfregaço com auxílio de uma lâmina extensora. Contaram-se cem células com auxílio de microscópio óptico com aumento de quatrocentas vezes, sendo classificados como vivos os espermatozoides que não estavam corados. Nesses dois tempos de incubação, também avaliaram-se a morfologia espermática e a integridade do acrossoma, com lâminas coradas com rosa de bengala.

Realizou-se ainda a análise computadorizada da motilidade espermática, com auxílio de um microscópio de contraste de fases acoplado a uma videocâmara adaptada ao sistema Sperm Class Analyser® (SCA, Microptic S.L., versão 3.2.0).

Para a análise computadorizada, fez-se uma rediluição da amostra, sendo 10 µl da amostra homogeneizadas em um segundo tubo Eppendorf®, contendo 50 µL de uma solução de citrato de sódio-glicose a 37°C (2,37 g citrato de sódio, 0,80 g glicose, 100 mL água destilada), a fim de ser atingida uma concentração de 20 a 50x10⁶ de spz/mL. Da amostra rediluída colocaram-se 5,0 µL uma Câmara de Makler® (Sel-Medical Instruments), previamente aquecida a 37°C, para avaliação dos parâmetros de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade média do percurso do espermatozoide (VAP, µm/s) e % de subpopulações de espermatozoides com velocidade média (VAP 55 a 95 µm/s) e rápida (VAP > 95 µm/s).

Teste hipo-osmótico

O teste hipo-osmótico (HOS) foi realizado após a coleta, e imediatamente após a descongelação do sêmen. Para isso, diluiu-se 0,01 mL de sêmen em 0,09 mL de água destilada (solução hipo-osmótica), mantendo-se em banho-maria a

38°C por 45 minutos. Após esse período, uma alíquota espermática foi colocada em uma lâmina de vidro, coberta com lamínula, sendo contadas duzentas células com o auxílio de microscópio óptico com aumento de quatrocentas vezes. A membrana espermática foi considerada funcional quando os espermatozoides apresentavam sua cauda enrolada (SPITTALER & TYLER, 1985).

Análise estatística

Os dados foram expressos na forma de média e erro-padrão e analisados pelo programa Systat 7.0 (SPSS Inc. 1997). Dados percentuais sofreram transformação angular arcoseno. ANOVA-GLM (General Linear Model) foi utilizada para verificar o efeito da temperatura e do tempo de exposição ao diluidor antes da criopreservação, sobre os parâmetros de motilidade (avaliação subjetiva) e vigor e, após a descongelação, sobre a morfologia espermática, integridade acrossomal, motilidade total, motilidade progressiva, subpopulações de espermatozoides rápidos e médios, VAP dos rápidos e médios, espermatozoides vivos e teste hipo-osmótico. Compararam-se as médias pelo teste de Tukey, para ser verificada a interação do efeito da temperatura de adição do glicerol e do tempo de incubação. Para todas as análises utilizou-se $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen a fresco apresentou características dentro dos padrões normais para a espécie canina (CHRISTIANSEN, 1988), com uma coloração branca opalescente; volume de 1,39 ± 0,26 mL; pH 6,04 ± 0,08; concentração espermática de 960 ± 150,86x10⁶ spz/mL; motilidade de 99,17 ± 0,56%; vigor 5 ± 0; 94,64 ± 0,73% de espermatozoides normais e 99,36 ± 0,25% de acrossoma intacto.

Durante o processamento do sêmen, observou-se que, à temperatura de 27°C, o G27 apresentou motilidade (99,58 ± 0,42) e vigor (5 ± 0) superiores ao G4 (92,92 ± 2,34 e 4,37 ± 0,20) ($P < 0,05$), não sendo observada essa diferença a 4°C (Tabela 1). Quando avaliado de forma isolada, G4 manteve seus padrões de motilidade e de vigor,

enquanto que no G27 foi observada uma redução, tanto da motilidade quanto do vigor após avaliação a 4°C ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Apesar da redução na motilidade observada no G27 após o resfriamento, considerou-se o

sêmen como apresentando uma boa qualidade. Essa queda na motilidade também foi relatada por SILVA et al. (2001) e CARDOSO et al. (2005), e utilizando diluidores à base de água de coco e Tris, respectivamente.

TABELA 1. Média \pm erro-padrão da motilidade e do vigor após a primeira avaliação a 27°C e após a segunda avaliação a 4°C do sêmen canino em ACP-106®

Grupos	Temperaturas avaliadas	Motilidade	Vigor
G4	4°C	92,92 \pm 2,34 ^{aA}	4,37 \pm 0,20 ^{aA}
	27°C	92,25 \pm 1,02 ^{aA}	4,46 \pm 0,17 ^{aA}
G27	4°C	99,58 \pm 0,42 ^{aB}	5 \pm 0 ^{aB}
	27°C	88,50 \pm 4,03 ^{bA}	4,50 \pm 0,20 ^{bA}

^{a,b} Letras minúsculas distintas indicam diferença entre as diluições do mesmo grupo.

^{A,B} Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre os grupos na mesma diluição.

TABELA 2. Média \pm erro-padrão da morfologia espermática e integridade de acrossoma, imediatamente e sessenta minutos após a descongelação do sêmen canino criopreservado em ACP-106®, submetido à glicerolização a 4°C (G4) e 27°C (G27)

Localização das alterações (%)	Sêmen descongelado, tratamentos e tempo de incubação			
	G4		G27	
	0'	60'	0'	60'
Cabeça				
Primárias	0,29 \pm 0,13	0,21 \pm 0,10	0,25 \pm 0,13	0,21 \pm 0,11
Secundárias	0,71 \pm 0,71	0,58 \pm 0,25	0,46 \pm 0,19	0,42 \pm 0,25
Peça intermediária				
Primárias	0,21 \pm 0,11	0,83 \pm 0,06	0,08 \pm 0,08	0,12 \pm 0,12
Secundárias	1,83 \pm 0,44	1,75 \pm 0,45	1,92 \pm 0,58	1,46 \pm 0,45
Cauda				
Primárias	0,17 \pm 0,09	0,42 \pm 0,29	0,04 \pm 0,04	0,12 \pm 0,06
Secundárias	4,17 \pm 0,57	5,87 \pm 0,99	5,75 \pm 0,82	5,96 \pm 0,72
Total sptz. normais	92,75 \pm 0,85	91,08 \pm 0,81	91,58 \pm 1,22	91,71 \pm 1,05
Acrossoma intacto	94,87 \pm 0,73	94,87 \pm 0,55	95,71 \pm 0,62	95,12 \pm 0,59

($P > 0,05$).

Após a descongelação, foi observado que os padrões de morfologia e integridade de acrossoma não sofreram influência da temperatura de adição do glicerol, nem redução nesses parâmetros com o passar do tempo de incubação no teste de termorresistência ($P > 0,05$). Os resultados de morfologia espermática e integridade de acrossomo estão

ilustrados na Tabela 2 e estão de acordo com os resultados obtidos por SILVA et al. (2005). Esses autores não encontraram diferença na morfologia espermática, nem na integridade acrossomal entre as temperaturas de glicerolização em ambos os tempos de incubação.

Durante o processo de criopreservação, resfriamento e descongelamento, ocorrem alterações químicas e físicas na membrana celular que levam à ruptura e remoção de importantes proteínas de membrana, alterações na estrutura da bicamada lipídica e lipoproteica da membrana plasmática, redução da fluidez, aumento da permeabilidade, danos no acrossoma, desidratação, liberação de enzimas e fosfolípidios, redução da atividade metabólica, diminuição do consumo de ATP, que podem comprometer de forma parcial ou total a fertilidade (FARSTAD, 1996; HOLT, 2000) e ainda reduzir a longevidade espermática e acelerar a capacitação (WATSON, 1995).

No presente trabalho, pôde-se notar que a integridade de membrana foi afetada pelo processo de criopreservação, visto que no sêmen a fresco o percentual de espermatozoides com membrana funcional foi de $89,75 \pm 2,82\%$, sendo observada uma redução significativa nesse número após a descongelamento em G4 e G27 (Tabela 3), não diferindo entre eles após a descongelamento ($P > 0,05$). Os valores obtidos neste trabalho são semelhantes aos de ROTA et al. (2006), os quais utilizaram dois observadores, obtendo $59 \pm 6,2\%$ e $71 \pm 4,5\%$, respectivamente, no percentual de espermatozoides com membrana funcional após a descongelamento. Essa redução no percentual de espermatozoides com membrana funcional provavelmente se deve às grandes alterações e danos ocorridos nas membranas espermáticas durante o processo de congelamento e descongelamento, conforme relatado por WATSON (1995).

TABELA 3. Média \pm erro do percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional após a descongelamento do sêmen canino criopreservado em ACP-106[®], submetido à glicerolização a 4°C (G4) e 27°C (G27)

Sêmen fresco (%)	Descongelado (%)	
	G4	G27
$89,75 \pm 2,82^a$	$65,33 \pm 6,41^b$	$67,33 \pm 7,50^b$

^{a,b} Letras minúsculas distintas indicam diferença na linha entre os grupos.

A viabilidade espermática pós-descongelamento não diferiu entre os grupos testados, sendo

observado, respectivamente em G4 e G27, $27,25 \pm 3,79\%$ e $32,42 \pm 4,13\%$ de espermatozoides vivos ($P > 0,05$). No entanto, após sessenta minutos de incubação no teste de termorresistência, observou-se uma redução no percentual de espermatozoides vivos para ambos os grupos, $9,83 \pm 2,52\%$ e $12,75 \pm 2,67\%$ ($P < 0,05$), G4 e G27, respectivamente, não diferindo entre si neste momento ($P > 0,05$).

Na avaliação computadorizada do sêmen imediatamente após a descongelamento, não se observou diferença entre G4 e G27, nos parâmetros de motilidade total (Figura 1A), motilidade progressiva (Figura 1B), percentual de espermatozoides com velocidade rápida (Figura 1C) e percentual de espermatozoides com velocidade média (Figura 1D). Notou-se uma redução em todos os parâmetros mencionados após trinta minutos de incubação e, a partir desse tempo, uma manutenção desses resultados até 120 minutos. Vale ressaltar que, nesses tempos, G4 e G27 não diferiram.

Pode-se observar, ainda, na análise computadorizada, que G4 e G27 não diferiram imediatamente após a descongelamento nas avaliações de velocidades médias da trajetória (VAP) dos espermatozoides com velocidade rápida (Figura 1E) e com velocidade média (Figura 1F), sendo registrada uma redução dessas duas velocidades após trinta minutos de incubação em ambos os grupos, não diferindo G4 e G27 nesse tempo. Após noventa minutos de incubação, notou-se uma nova redução da VAP dos espermatozoides com velocidade rápida (Figura 1E), que se manteve até 120 minutos, não diferindo G4 e G27 em cada tempo mencionado. Uma segunda redução da VAP dos espermatozoides com velocidade média foi observada apenas aos 120 minutos de incubação, não diferindo G4 e G27 neste tempo.

Notou-se uma baixa motilidade espermática, quando comparada aos resultados obtidos por SILVA et al. (2005) e CARDOSO et al. (2006), que obtiveram, respectivamente, uma motilidade de 51% e 65% pós-descongelamento, utilizando diluidor à base de água de coco e Tris. No entanto, utilizou-se uma concentração de 20% de gema

de ovo de galinha no diluidor, enquanto que no presente trabalho empregou-se concentração de somente 5%. Sabe-se que a gema de ovo vem sendo adicionada aos diluidores como protetores do resfriamento em concentrações que variam de

3% a 25% (v/v - WATSON, 1979). Sua função é preservar os espermatozoides durante o choque térmico, bem como durante a congelação e descongelação (FARSTAD, 1996).

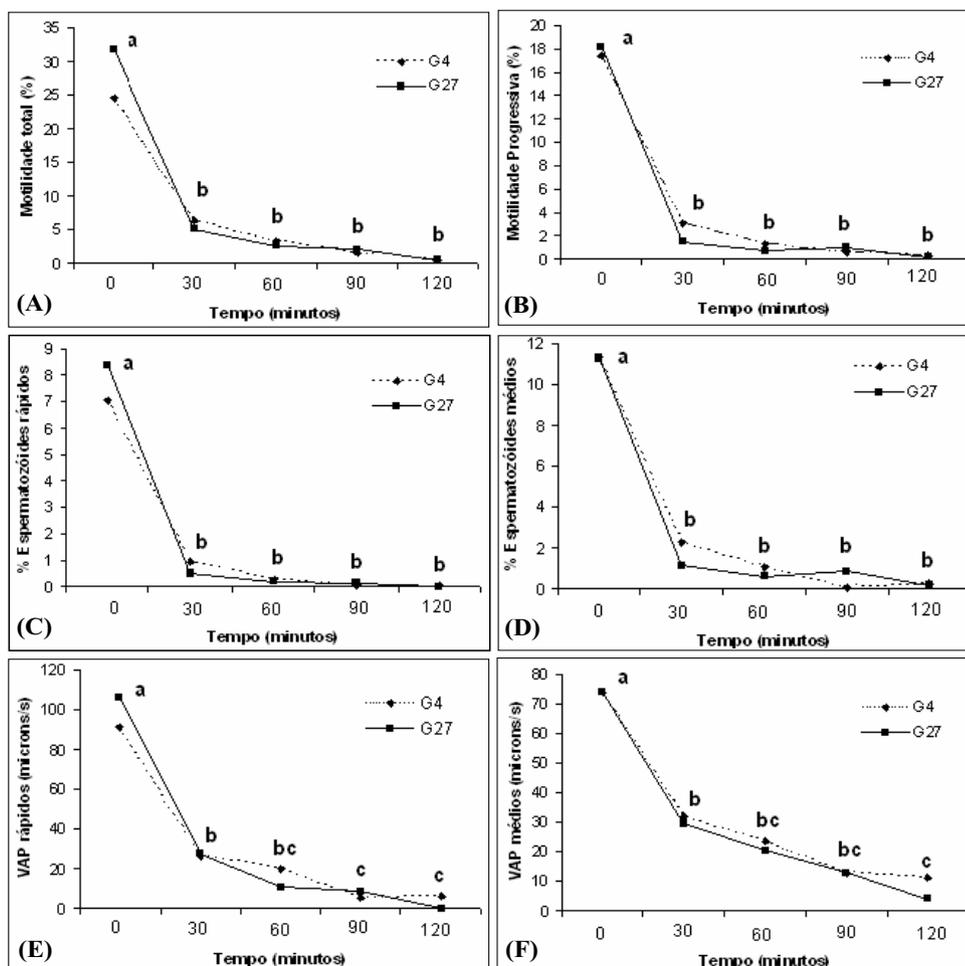


FIGURA 1. Análise espermática computadorizada pós-descongelação do sêmen canino criopreservado em ACP-106®, submetido à glicerolização a 4°C (G4) e 27°C (G27). (A) motilidade total (%); (B) Motilidade progressiva (%); (C) percentual médio da subpopulação de espermatozoides rápidos; (D) percentual médio da subpopulação de espermatozoides e médios; (E) VAP média da subpopulação de espermatozoides rápidos; (F) VAP média da subpopulação de espermatozoides médios ($\mu\text{m/s}$).

^{a,b,c} Letras minúsculas distintas indicam diferença entre os grupos para o mesmo parâmetro avaliado ($P < 0,05$).

LEI et al. (2007), utilizando diluidor Tris acrescido de 5% de gema de ovo de pomba, obtiveram uma motilidade de 35% para o espermatozoide bovino descongelado. CARDOSO (2005), usando diluidor ACP-106® acrescido de 20% de gema de ovo, obteve uma motilidade total de 23%, motilidade progressiva de 18% e uma VAP de $85,3\mu\text{m/s}$, sendo ambos os resultados semelhantes

aos observados neste trabalho. CARDOSO (2005) justificou seus baixos resultados em virtude da insuficiente homogeneização do diluidor com a gema de ovo, formando grumos, aliada à alta viscosidade do meio, dificultando a motilidade dos espermatozoides e sua avaliação pelo CASA.

CONCANNON & BATTISTA (1989) sugerem que aproximadamente 40% a 50% de

espermatozoides móveis são necessários para obtenção de sucesso na inseminação artificial com sêmen canino congelado. No entanto, gestações vêm sendo obtidas com sêmen congelado com motilidade pós-descongelção entre 20% e 30% (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989).

Registrou-se uma baixa longevidade espermática. No entanto, OLAR (1984) sugere que, para a avaliação da capacidade fecundante do espermatozoide canino, a motilidade imediatamente após a descongelção é mais importante do que sua sobrevivência após incubação.

Sabe-se ainda que não foi estabelecida a relação entre longevidade espermática e o potencial fecundante do sêmen para a espécie canina e que a VAP avaliada através da CASA apresenta relação significativa com as interações *in vitro* entre espermatozoides caninos congelados descongelados e oócitos homólogos (SILVA, 2005).

A VAP, neste trabalho, é semelhante à velocidade encontrada por SILVA et al. (2006) e SCHÄFER-SOMI & AURICH (2006), os quais utilizaram o diluidor Tris e obtiveram, respectivamente, uma VAP média de 100,9 e 109 $\mu\text{m/s}$.

Estudos devem ser realizados para ser melhorada a motilidade pós-descongelção utilizando o diluidor ACP-106[®], sendo talvez a concentração de gema de ovo a grande responsável pela baixa motilidade. Essa hipótese tem como base resultados obtidos por CARDOSO et al. (2002), que ao testarem diversas formas de criopreservação do sêmen canino com água de coco *in natura* observaram que a motilidade pós-descongelção das amostras congeladas com o diluidor com 20% de gema de ovo foi mais bem preservada do que aquelas congeladas com o mesmo diluidor sem gema. Embora a forma de preparação do diluidor do presente trabalho e a de CARDOSO et al. (2002) tenham sido diferentes, ambos são constituídos da mesma base, qual seja, a água de coco.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que não há influência da adição do glicerol à temperatura ambiente (27°C) ou após o resfriamento

a 4°C, com a utilização do diluidor ACP-106[®], na qualidade do sêmen canino.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, ao CNPq e à FUNCAP, pelo apoio financeiro; aos proprietários dos cães, em particular a Daniel Couto Uchoa, por disponibilizar os animais para o estudo; ao Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo, pela colaboração nas análises estatísticas, e ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino, pela disponibilização de uso do CASA.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. **Zuchtygiene**, v. 10, p. 1-4, 1975.
- CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v. 59, p. 743-775, 2003a.
- CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Determinação da concentração espermática no sêmen de cães Pastores Alemães através da espectrofotometria. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 384-386, 2003b.
- CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Use of the powdered coconut water (ACP[®]-106) for cyopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 2, p. 257-262, 2005.
- CARDOSO, R. C. S. **Características *in vitro* do espermatozoide canino criopreservado em água de coco**. 2005. 197 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.
- CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 384-391, 2006.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.
- CHRISTIANSEN, I. J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1988.

- GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v. 59, p. 1241-1255, 2003.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- IVANOVA-KICHEVA, M. G.; BOBADOV, N. D.; SOMLEV, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, v. 48, p. 343-349, 1997.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.
- NÖTHLING, J. O.; SHUTTLEWORTH, R.; The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 1469-1480, 2005.
- OLAR, T. T. **Cryopreservation of dog spermatozoa**. 1984. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Colorado State University, 1984.
- OLIVEIRA E. C. S. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino**. 2003, 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.
- PEÑA, A. I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L. A.; HERRADÓN, P. G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v. 50, p. 163-174, 1998.
- ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Effect of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v. 47, p. 1093-1101, 1997.
- ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparation between glycerol and ethilene glycol for dog sêmen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, p. 1848-1858, 2006.
- SILVA, A. R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com óocitos homólogos**. 2005. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, 2005.
- SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Efeito das etapas do processamento de criopreservação sobre a qualidade do sêmen canino diluído em Tris. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 474-474, 2001.
- SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-829, 2003.
- SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Influence of temperature during glicerol addition and post-thaw dilutin on the quality of canine frozen semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 1-5, 2005.
- SPITTALER, P. J.; TYLER, J. P. P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity os spermatozoal membrane. **Clinical Reproduction and Fertility**, v. 3, p. 187-190, 1985.
- VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOUIS, G.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw sperm motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 907-919, 2000.
- YILDITZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p. 579-585, 2000.

Protocolado em: 12 nov. 2007. Aceito em: 13 fev. 2009.