

EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESCONGELAÇÃO SOBRE O SÊMEN CANINO CRIOPRESERVADO EM DILUIDOR À BASE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-106®)

VICTOR LEÃO HITZSCHKY MADEIRA,¹ CYNTHIA LEVI BARATTA MONTEIRO,¹ CLAUDIA DA CUNHA BARBOSA,¹ RICARDO PARENTE JUCA,² ÂNGELA CRISTINA DE OLIVEIRA,³ DANIEL COUTO UCHOA⁴ E LÚCIA DANIEL MACHADO DA SILVA⁵

1. Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará

2. Acadêmico da Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Ceará

3. Médica veterinária autônoma

4. Doutorado do Programa de Pós-Graduação Rede Nordeste de Biotecnologia

5. Professor adjunto da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.

E-mail: lucia.daniel.machado@hotmail.com

RESUMO

Sabe-se que a temperatura, bem como a velocidade de descongelamento do sêmen, pode afetar a qualidade deste. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes protocolos de descongelamento para o sêmen canino diluído em ACP-106® e criopreservado. Para tanto, coletaram-se dez ejaculados oriundos de oito cães, sendo a fração espermática avaliada quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor, pH, morfologia, integridade acrosomal e teste hiposmótico. Diluiu-se o sêmen em ACP-106®, contendo 20% de gema de ovo e 6% de glicerol, sendo congelado em palhetas de 0,25 mL. Depois de uma semana, a primeira palheta foi

descongelada a uma temperatura de 37°C/60s, a segunda a 55°C/5s e a terceira a 75°C/8s e reavaliaram-se os parâmetros seminais. Os protocolos apresentaram resultados semelhantes para quase todos os parâmetros avaliados, com exceção da motilidade espermática, que foi melhor preservada na descongelamento a 55°C/5s por até trinta minutos, seguida do protocolo de 37°C/60s e por último o de 75°C/8s. Analisando-se estes resultados, pode-se concluir que, para o sêmen canino congelado no diluidor ACP-106®, o melhor protocolo para descongelamento foi o de 55°C/5s.

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

ABSTRACT

EFFECT OF DIFFERENT THAWING PROTOCOLS ON CANINE SEMEN CRYOPRESERVED IN A POWDERED COCONUT WATER EXTENDER (ACP-106®)

It is known that temperature and thawing velocity can affect sperm quality during freeze-thawing procedures. Thus, the aim of this research was to compare different thawing protocols for canine semen extended in ACP-106® extender and cryopreserved. Ten ejaculates were collected from eight dogs and sperm rich fraction was evaluated regarding volume, concentration, motility, vigor, pH, morphology, acrosomal integrity and hyposmotic swelling test. Then, semen was extended in ACP-106® with 20% egg yolk and

6% glycerol, and frozen in 0.25 mL straws. After one week, one straw was thawed at 37°C/60s, another one at 55°C/5s and a third one at 75°C/8s, and the seminal characteristics were reevaluated. Similar results were observed for all the groups, except for sperm motility which was better preserved at 55°C/5s for up 30min than at 37°C/60s or 75°C/8s. From these results, it is concluded that canine semen extended in ACP-106® is better thawed at 55°C/5s.

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

INTRODUÇÃO

Atualmente o interesse por parte dos criadores de cães em usufruir dos benefícios das biotecnologias aplicadas à reprodução tem aumentado consideravelmente. No caso particular da criopreservação do sêmen, podem ser destacadas, como principais vantagens, o fato de que é possível armazenar o material genético de animais de alto valor zootécnico por um período ilimitado, transmitindo as características desses animais por várias gerações, mesmo após a morte do animal (SILVA et al., 2003). Apesar dessas vantagens, muitos pontos que aparentemente influenciam na sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides criopreservados permanecem não identificados, o que resulta em taxas de gestação altamente variáveis e geralmente mais baixas do que aquelas obtidas com sêmen fresco (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1993).

A fim de melhorar estes resultados, vários pesquisadores vêm somando esforços no intuito de aperfeiçoar os protocolos de congelação do sêmen canino. Um exemplo disso é o desenvolvimento de diluidores alternativos que sejam atóxicos, isotônicos, tenham atividade tamponante, sejam de baixo custo, práticos e eficientes. O diluidor à base de água de coco tem em sua composição básica açúcares, proteínas, vitaminas, sais minerais, fatores de crescimento (fitormônios) e um baixo teor de fosfolípido. A sua formulação em pó (ACP-106[®]) foi testada para a refrigeração de sêmen equino (SAMPAIO-NETO et al., 2002), diluição para inseminação artificial em caprinos (SALGUEIRO et al., 2002), refrigeração (MADEIRA et al., 2003) e congelação de sêmen canino (CARDOSO et al., 2005), apresentando bons resultados.

Outro ponto de extrema importância para a melhoria dos resultados na congelação do sêmen é a metodologia empregada na descongelação. Investigações recentes têm levado à hipótese de que os espermatozoides criopreservados são danificados, principalmente, durante a descongelação (GAO et al., 1992; HOLT et al., 1992; CURRY & WATSON, 1994; HOLT & NORTH, 1994). Por razões práticas, o sêmen canino é frequentemente descongelado a 37°C/1-3 minutos, embora vários pesquisadores tenham verificado que a descongelação a temperaturas maiores melhora a viabilidade dos espermatozoides (ENGLAND & ALLEN, 1992).

Em trabalhos para comparação da temperatura e do tempo de descongelação sobre a qualidade espermática canina, observou-se que a temperatura de descongelação mais alta por um menor tempo promoveu uma melhor qualidade pós-descongelação (IVANOVA-KICHEVA et al., 1995; PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000). No entanto, SILVA et al. (1998), trabalhando com cães, e MINTER & DeLIBERTO (2005), com coiotes, observaram uma melhor qualidade espermática pós-descongelação em temperaturas mais baixas e por maior tempo. NÖTHLING et al. (2007) constataram que a descongelação do sêmen canino a 98°C por 6,5s não trouxe benefícios, comparada à de 70°C por 8s. CHIRINÉA et al. (2006) utilizaram um método de descongelação a 75°C por 8s para o sêmen de cães e obtiveram excelente qualidade espermática. NÖTHLING & SHUTTLEWORTH (2005), além de verificarem o protocolo de descongelação, relacionaram o tamanho da palheta e observaram que as amostras congeladas em palhetas de 0,5 mL foram as que apresentaram os melhores resultados pós-descongelação.

Diante do exposto, percebe-se que ainda existem muitas variações no que diz respeito ao melhor protocolo de descongelação. Além disso, nenhum trabalho propôs o melhor protocolo de descongelação quando se usa ACP-106[®] como diluidor. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes protocolos de descongelação sobre a qualidade do sêmen canino criopreservado com um diluidor à base de água de coco em pó (ACP-106[®]).

MATERIAL E MÉTODOS

Local de execução

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução de Carnívoros localizado na cidade de Fortaleza, CE, Brasil.

Animais experimentais

Foram utilizados oito cães, oriundos de canis particulares, sendo dois da raça Boxer, um da raça Retriever do Labrador, um da raça Rottweiler, um da raça Cane Corso, um da raça Bullmastif, um da raça American Pit Bull Terrier e um da raça Whippet com idades entre dois e nove anos. Os cães, mantidos em canis individuais, receberam alimentação à base de ração comercial peletizada uma vez por dia e tiveram acesso à água *ad libitum*.

Coleta do sêmen

O sêmen foi coletado por meio da técnica de manipulação digital do bulbo peniano com o auxílio de um funil de plástico e tubos de vidro graduados. Como no cão a ejaculação ocorre de forma fracionada, fez-se a separação do sêmen em suas três frações distintas, sendo a primeira e a terceira de origem prostática desprezadas e a segunda, denominada fração espermática, de origem testicular e rica em espermatozoides retida para fins de avaliação e posterior criopreservação (SILVA et al., 2003). No total, coletaram-se e processaram-se dez ejaculados, sendo que os cães das raças Retriever do Labrador e Cane Corso foram coletados por duas vezes.

Avaliação do sêmen

A segunda fração do sêmen coletada foi avaliada macro e microscopicamente. As avaliações macroscópicas incluíram cor, volume e pH. Já as microscópicas incluíram motilidade (porcentagem de espermatozoides móveis 0-100%), vigor (qualidade da motilidade), que foi avaliado em uma escala variando de 0 (sem movimento) a 5 (movimento retilíneo progressivo), concentração e morfologia espermáticas, bem como a integridade acrossomal (PLATZ & SEAGER, 1977).

Avaliaram-se a cor e o volume apenas no sêmen fresco. O pH, a morfologia espermática e a integridade do acrossoma foram avaliados no sêmen fresco e congelado/descongelado.

As avaliações de motilidade e vigor foram realizadas com o auxílio da microscopia óptica (M.O.), no aumento de 100x. Verificou-se a concentração espermática em câmara de Neubauer, utilizando-se uma diluição de 5 µL de sêmen para 1 mL de solução salina formolizada (CARDOSO et al., 1997).

Para a avaliação da morfologia e integridade acrossomal, realizaram-se preparações úmidas, as quais foram coradas com Rosa de Bengala e, posteriormente, avaliadas utilizando-se um microscópio óptico (1000x), fazendo-se a contagem de duzentas células espermáticas. No tocante à morfologia, classificaram-se os espermatozoides como normais ou apresentando alterações morfológicas primárias ou secundárias, sendo separadas de acordo com a sua localização e o acrossoma classificado como normal ou danificado (SILVA et al., 2009).

Teste hiposmótico

Realizou-se o teste hiposmótico (HOS) após a coleta e imediatamente após a descongelação do sêmen, tendo como função avaliar a integridade funcional da membrana espermática (SPITTALER & TYLER, 1985). Para isso, 0,01 mL de sêmen foi diluído em 0,09 mL de água destilada e mantido em banho-maria a 38 °C. Após 45 minutos, os espermatozoides de cada alíquota foram colocados em uma lâmina e avaliados em microscópio óptico. Contaram-se duzentas células em aumento de 400x, sendo os espermatozoides que apresentavam sua cauda enrolada considerados como tendo a membrana espermática funcional.

Teste de termorresistência

O teste de termorresistência foi realizado após a descongelação do sêmen, sendo este mantido em banho-maria a 38 °C. Avaliaram-se a motilidade e o vigor espermático imediatamente após a descongelação e aos trinta, sessenta, noventa e 120 minutos.

Preparo do diluidor

Utilizou-se um diluidor à base de água de coco em pó (ACP-106®), preparado de acordo com a orientação do fabricante. O diluidor continha 20% de gema de ovo e 6% de glicerol (concentração final no diluidor).

Processamento do sêmen

O sêmen foi processado conforme descrito por CARDOSO et al. (2003). O volume total de diluidor a ser acrescido ao sêmen foi dividido em duas partes (A e B), sendo a parte A composta apenas pelo ACP-106® acrescido de gema de ovo e a parte B, similar à anterior, mas contendo 12% de glicerol.

O sêmen foi diluído inicialmente com metade do volume de diluidor necessário para a obtenção da concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL. Nesta etapa, utilizou-se somente a parte A do diluidor. Após esta diluição inicial em temperatura ambiente (aproximadamente 27°C), as amostras foram armazenadas em tubos de vidro e estes colocados em um recipiente com água e acondicionados em caixa térmica plástica de 3 L, medindo 14 cm de largura, 21 cm de comprimento e 15 cm de altura com gelo reciclável (15°C) por quarenta minutos. Após este período, transferiu-se o sêmen para um refrigerador até atingir

4 °C, o que demorou trinta minutos e, posteriormente, adicionou-se a parte B ao sêmen. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, sendo estas dispostas horizontalmente em rampa de congelamento a uma altura de 5 cm do nível de nitrogênio líquido por cinco minutos e, finalmente, armazenadas em nitrogênio líquido. Após uma semana, as amostras foram descongeladas em banho-maria, sendo a primeira palheta descongelada a 37°C/60s, a segunda a 55°C/5s e a terceira a 75°C por 8s e avaliadas microscopicamente.

Análise estatística

Avaliaram-se as características macroscópicas do sêmen fresco de forma subjetiva, exceto o volume da fração espermática, que, juntamente com as características microscópicas, foi submetido à estatística descritiva e expresso na forma de média e desvio-padrão. A análise dos dados foi realizada pelo programa Systat 7.0 (SPSS Inc. 1997). Os dados percentuais sofreram transformação angular arco seno. Para verificar as diferenças estatísticas entre os protocolos com relação à motilidade, vigor, morfologia, integridade acrossomal e porcentagem de caudas enroladas, utilizou-se ANOVA-GLM (General Linear Model) e nos casos em que houve diferenças estatísticas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, para se verificar onde ocorreram as diferenças. Para todas as análises utilizou-se $P < 0,05$.

RESULTADOS

No tocante ao sêmen fresco, observou-se que todos os ejaculados apresentaram-se de cor branco opalescente e viscosidade leitosa e que os demais parâmetros (macro e microscópicos) encontravam-se dentro da normalidade (Tabela 1), como descrito por SILVA et al. (2003).

A motilidade espermática do sêmen descongelado a 55°C/5s (58,50 ± 14,92%) foi melhor do que no descongelado a 37°C/60s (46,00 ± 11,74%), que, por sua vez, foi melhor do que a 75°C/8s (19,60 ± 29,31%) nos tempos zero e trinta minutos. O sêmen fresco foi o que apresentou o melhor resultado de motilidade ($P < 0,05$ – Tabela 2). A partir de sessenta minutos, não houve mais diferença entre a motilidade nos três protocolos de descongelamento testados ($P > 0,05$ – Tabela 2). Quando se compara a motilidade dentro de cada

grupo ao longo do tempo, observa-se que, nos protocolos de descongelamento 37°C/60s e 55°C/5s, no tempo 0 min, ela foi superior a todos os outros tempos, e no tempo de trinta minutos foi superior aos tempos de sessenta, noventa e 120 minutos ($P < 0,05$) e a partir dos sessenta minutos não houve mais diferenças ($P > 0,05$). Para as amostras descongeladas a 75°C/8s, a motilidade não diferiu das demais em momento algum ($P > 0,05$ - Tabela 2).

TABELA 1. Média ± desvio-padrão do pH, volume, concentração, motilidade, vigor, morfologia e acrossomas intactos do sêmen fresco (n = 10 ejaculados)

Parâmetros avaliados	Média ± D.P.
Volume da fração espermática (µL)	785,00 ± 380,83
pH	6,40 ± 0,46
Concentração espermática (n° spztz X 10 ⁶ /mL)	1.374,00 ± 744,80
Motilidade (0-100%)	99,00 ± 2,11
Vigor (0-5)	5,00 ± 0,00
Espermatozoides normais (%)	87,90 ± 11, 24
Alterações morfológicas de cabeça	
Primárias (%)	0,90 ± 1,10
Secundárias (%)	1,70 ± 3,74
Alterações morfológicas de peça intermediária	
Primárias (%)	0,20 ± 0,63
Secundárias (%)	2,40 ± 5,21
Alterações morfológicas de cauda	
Primárias (%)	0,10 ± 0,32
Secundárias (%)	6,70 ± 3,65
Acrossomas intactos (%)	91,30 ± 4,92

Com relação ao vigor espermático do sêmen descongelado, este não diferiu nos protocolos de 37°C/60s e 55°C/5s em todos os tempos avaliados, mas ambos apresentaram resultados melhores que o protocolo 75°C/8s nos tempos zero e trinta minutos ($P < 0,05$). No que diz respeito à comparação dos protocolos entre os tempos, o vigor se manteve inalterado até trinta minutos. A partir de sessenta minutos, houve uma redução significativa no vigor, que se manteve estável até 120 minutos (Tabela 3).

Para as características morfológicas dos espermatozoides, não houve diferenças entre as alterações primárias de cabeça, peça intermediária e de cauda e

secundárias de peça intermediária entre nenhum dos protocolos e em relação ao sêmen fresco ($P > 0,05$). Já com relação às alterações secundárias de cabeça e cauda, observaram-se algumas diferenças. No caso das alterações secundárias de cabeça, os protocolos 37°C/60s e 75°C/8s foram semelhantes entre si ($P > 0,05$) e apresentaram um aumento nas alterações

morfológicas quando comparados ao sêmen fresco ($P < 0,05$), ao passo que o protocolo 55°C/5s não diferiu do sêmen fresco, nem dos demais protocolos ($P > 0,05$). Com relação às alterações secundárias de cauda, todos os protocolos foram semelhantes entre si e apresentaram mais alterações que o sêmen fresco (Tabela 4).

TABELA 2. Média \pm desvio-padrão da motilidade espermática pós-descongelamento em três diferentes protocolos de descongelamento (37°C/60s, 55°C/5s e 75°C/8s) nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 minutos após a descongelamento

Protocolo de descongelamento	Motilidade				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
37°C/60seg	46,00 \pm 11,74 ^{ba}	14,50 \pm 11,41 ^{bb}	2,10 \pm 4,79 ^{ac}	0,60 \pm 1,58 ^{ac}	0,10 \pm 0,32 ^{ac}
55°C/5seg	58,50 \pm 14,92 ^{aa}	36,50 \pm 17,80 ^{ab}	8,80 \pm 13,14 ^{ac}	2,50 \pm 6,35 ^{ac}	1,50 \pm 3,37 ^{ac}
75°C/8seg	19,60 \pm 29,31 ^{ca}	6,20 \pm 13,41 ^{ca}	4,00 \pm 12,65 ^{aa}	1,00 \pm 3,16 ^{aa}	0,50 \pm 1,58 ^{aa}

^{a,b,c} Letras minúsculas diversas indicam diferença entre linhas.

^{A,B,C} Letras maiúsculas diversas indicam diferença entre colunas.

$P < 0,05$

TABELA 3. Média \pm desvio-padrão do vigor espermático entre três diferentes protocolos de descongelamento (37°C/60s, 55°C/5s e 75°C/8s) nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 minutos após a descongelamento

Protocolo de descongelamento	Vigor				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
37°C/60seg	3,40 \pm 0,46 ^{aa}	2,60 \pm 1,02 ^{aa}	0,60 \pm 1,05 ^{ab}	0,40 \pm 0,88 ^{ab}	0,20 \pm 0,63 ^{ab}
55°C/5seg	3,80 \pm 0,35 ^{aa}	3,40 \pm 0,57 ^{aa}	1,30 \pm 1,32 ^{ab}	0,45 \pm 1,12 ^{ab}	0,40 \pm 0,97 ^{ab}
75°C/8seg	1,60 \pm 1,88 ^{ba}	0,85 \pm 1,41 ^{ba}	0,20 \pm 0,63 ^{ab}	0,20 \pm 0,63 ^{ab}	0,10 \pm 0,32 ^{ab}

^{a,b} Letras minúsculas diversas indicam diferença entre linhas.

^{A,B} Letras maiúsculas diversas indicam diferença entre colunas.

$P < 0,05$

TABELA 4. Média \pm desvio-padrão das alterações morfológicas primárias e secundárias da cabeça, peça intermediária e cauda e do total de espermatozoides normais em relação ao sêmen fresco e aos protocolos 37°C/60s, 55°C/5s e 75°C/8s

Alterações %	Grupos			
	Fresco	37°C/60s	55°C/5s	75°C/8s
Cabeça				
Primária	1,70 \pm 3,74 ^a	1,10 \pm 2,23 ^a	0,80 \pm 0,79 ^a	1,60 \pm 3,37 ^a
Secundária	0,90 \pm 1,10 ^a	3,10 \pm 2,47 ^b	1,20 \pm 0,63 ^{ab}	3,70 \pm 4,37 ^b
Peça intermediária				
Primária	0,20 \pm 0,63 ^a	0,60 \pm 0,70 ^a	0,10 \pm 0,32 ^a	0,40 \pm 0,52 ^a
Secundária	2,40 \pm 5,21 ^a	4,70 \pm 7,10 ^a	2,30 \pm 3,20 ^a	5,60 \pm 6,27 ^a
Cauda				
Primária	0,10 \pm 0,32 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a
Secundária	6,70 \pm 3,65 ^a	21,90 \pm 13,67 ^b	20,20 \pm 12,41 ^b	18,20 \pm 13,89 ^b
Total de normais	88,00 \pm 11,00 ^a	68,60 \pm 20,00 ^b	75,40 \pm 13,87 ^b	70,50 \pm 20,29 ^b

^{a,b} Letras minúsculas diversas indicam diferença entre colunas.

$P < 0,05$

Neste estudo, observou-se que não houve diferenças com relação à porcentagem de acrossomas intactos entre os protocolos, mas todos apresentaram uma porcentagem menor de acrossomas intactos em relação ao sêmen fresco (Figura 1).

Houve uma redução significativa no percentual de células que foram reativas ao teste hiposmótico em todos os protocolos com relação ao sêmen fresco, não diferindo entre os protocolos após a descongelamento (Figura 2).

Não houve alteração do pH nos protocolos de 37°C/60s e 55°C/5s ($P > 0,05$), no entanto, houve uma redução do pH no protocolo de 75°C/8s em relação ao sêmen fresco ($P < 0,05$) (Figura 3).

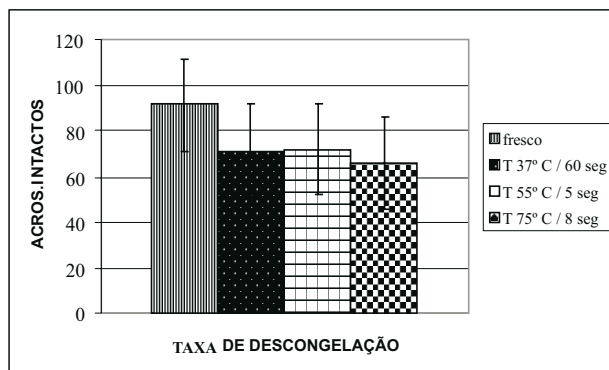


FIGURA 1. Porcentagem média \pm DP de células com acrossoma intacto do sêmen fresco e logo após a descongelamento a 37°C/60s, 55°C/5s e 75°C/8s. $P < 0,05$.

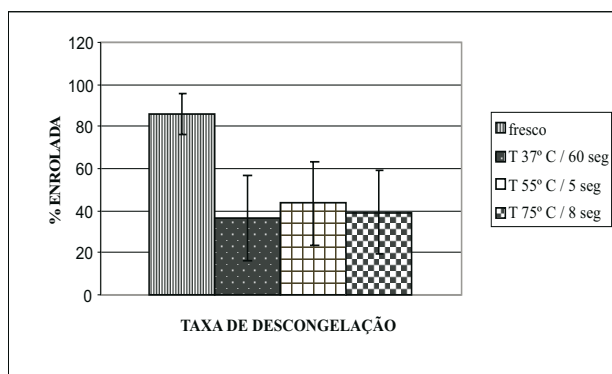


FIGURA 2. Porcentagem média \pm DP de células com cauda enrolada do sêmen fresco e descongelado a 37°C/60s, 55°C/5s e 75°C/8s após o teste hiposmótico. $P < 0,05$.

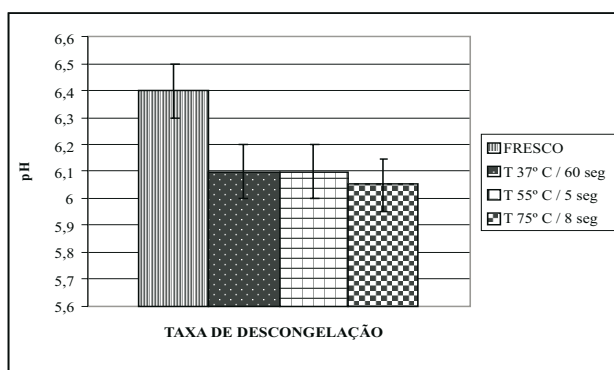


FIGURA 3. Média \pm DP do pH de amostras do sêmen fresco e logo após a descongelamento a 37°C/60s, 55°C/5s e 75°C/8s. $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

De acordo com a análise dos resultados do sêmen fresco, observou-se que as amostras estavam aptas a participarem do experimento, visto que todos os parâmetros avaliados apresentavam-se dentro da normalidade para a espécie canina, conforme descrito por SILVA et al. (2003).

Com relação à motilidade pós-descongelamento, este estudo demonstrou que existe uma diferença significativa entre os três protocolos de descongelamento, sendo que o de 55°C/5s apresentou os melhores resultados por até trinta minutos após a descongelamento, seguido pelo de 37°C/60s e, por último, o protocolo 75°C/8s. Resultado semelhante foi obtido por IVANOVA-KICHEVA et al. (1995), que obtiveram uma

melhor motilidade quando descongelaram o sêmen de cães a 55°C/5s em comparação com a descongelamento a 37°C/8s. Segundo IVANOVA-KICHEVA et al. (1995), descongelar o sêmen em temperaturas mais altas reduz os efeitos destrutivos dos processos osmóticos nas estruturas dos espermatozoides. Além disso, o aumento rápido da temperatura de -196°C a 55°C por 5s impede a recristalização intracelular, o que provavelmente favoreceu o protocolo 55°C/5s em relação ao protocolo 37°C/60s. Embora tenha havido uma superioridade estatisticamente significativa da motilidade do protocolo 55°C/5s em relação ao 37°C/60s, percebe-se que ambos os protocolos apresentaram uma motilidade dentro da faixa aceitável para a realização de inseminações artificiais, levando-se em consideração os dados de THOMASSEN et al. (2006), que sugerem, para a

espécie canina, a motilidade pós-descongelamento acima de 50% como ideal e acima de 30% como aceitável, visto que é necessário um número adequado de espermatozoides móveis para que estes possam chegar até o oviduto e realizar a fecundação.

NÖTHLING & SHUTTLEWORTH (2005) relacionaram o tamanho da palheta com o protocolo de descongelamento e observaram que as amostras congeladas em palhetas de 0,5 mL e descongeladas a 70°C por 8s foram as que apresentaram os melhores resultados. PEÑA & LINDE-FORSBERG (2000) observaram que todos os parâmetros avaliados foram significativamente melhores quando se descongelaram os espermatozoides a 70°C por 8s quando comparados com 37°C por 15s. CHIRINÉA et al. (2006) utilizaram um método de descongelamento a 75°C por 8s para o sêmen de cães e obtiveram excelente qualidade espermática pós-descongelamento. Percebe-se que todos esses pesquisadores conseguiram bons resultados na descongelamento do sêmen a altas temperaturas e todos eles atribuem a esses bons resultados a mesma justificativa de IVANOVA-KICHEVA et al. (1995). Contudo, nesses experimentos, diferentemente deste, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL. Diante disso, é possível que a influência letal das altas temperaturas sobre a viabilidade dos espermatozoides seja maior sobre palhetas de 0,25 mL em relação a palhetas de 0,5 mL, pois o conteúdo da palheta de 0,25 mL descongelaria mais rapidamente que o da palheta de 0,5 mL e, sendo assim, o sêmen descongelado da palheta de 0,25 mL permaneceria por mais tempo a uma temperatura elevada. A partir do que foi exposto, acredita-se que o resultado obtido na descongelamento a 75°C/8s poderia ser melhorado caso fosse usada uma palheta de 0,5 mL ou então fosse diminuído o tempo de exposição à temperatura de 75°C. Outro ponto importante é que nenhum destes autores utilizou a água de coco como diluidor e, diante disso, é possível que a redistribuição do calor durante a descongelamento e a proteção dos espermatozoides durante este processo sejam diferentes para o diluidor à base de água de coco em pó.

Com relação ao vigor espermático, não houve diferença entre os protocolos 55°C/5s e 37°C/60s e novamente o pior protocolo de descongelamento foi o de 75°C/8s, sendo a provável causa, para isso, o efeito deletério da alta temperatura.

No tocante às alterações morfológicas, acrosomas intactos e caudas enroladas, após o teste hipos-

mótico não se verificaram diferenças entre os protocolos, mostrando que não houve efeito diferenciado da temperatura e do tempo de congelamento sobre essas características seminais. Observaram-se um maior percentual de alterações totais e secundárias da cabeça e cauda e uma diminuição de acrosomas intactos e caudas reativas ao teste hiposmótico em relação ao sêmen fresco, indicando que, provavelmente, o efeito de redução da qualidade seminal pós-descongelamento deveu-se ao processo de congelamento.

Com relação ao pH, constatou-se que a ação tamponante do diluidor foi extremamente eficaz, dada a capacidade de manter o pH dentro da normalidade ao longo de todo experimento (CHRISTHIANSEN, 1988).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, sugere-se que o melhor protocolo de descongelamento para o sêmen de cães utilizando como diluidor o ACP-106® é 55°C/5s, já que este proporcionou uma melhor motilidade por até trinta minutos após a descongelamento.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, ao CNPq e à FUNCAP, pelo apoio financeiro; aos proprietários dos cães, em particular ao 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

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Relação entre espectrofotômetro e a câmera de Neubauer na determinação da concentração espermática canina. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 2., 1997, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza, 1997. p. 284. Disponível em: <http://www.propgpq.uece.br/semana_universitaria/anais/anais1997/SemanaII/ic97.htm>.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Use of the powdered coconut water (ACP®-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 2, p. 257-262, 2005.

- 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. 743-751, 2003.
- CHIRINÉA, V. H.; MARTINS, M. I. M.; SOUZA, F. F.; TEBET, J. M.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 407-415, out./dez. 2006.
- CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**, v. 31, p. 39-46, 1994.
- ENGLAND, G. C. W.; ALLEN, W. E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II: Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v. 37, p. 373-381, 1992.
- GAO, D. Y.; MAZUR, P.; KLEINHANS, F. W.; WATSON, P. F.; NOILES, E. F.; CRITSER, J. K. Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. **Cryobiology**, v. 29, p. 657-667, 1992.
- HOLT, W. V.; HEAD, M. F.; NORTH, R. D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1086-1094, 1992.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 414-424, 1994.
- IVANOVA-KICHEVA, M. G.; SUBEV, M. S.; BOBADOV, N. D.; DACHEVA, D. P.; ROUSEVA, I. A. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 44, p. 563-569, 1995.
- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl. 47, p. 313-323, 1993.
- MADEIRA, V. L. H.; CARDOSO, J. F. S.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Uso da água de coco em pó como diluidor para a conservação do sêmen de cães a 4°C In: SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 8., 2003, Fortaleza. **Anais... Fortaleza**, 2003. Disponível em: <http://www.propgpq.uece.br/semana_universitaria/anais/anais2003/index_conteudo.htm>.
- MINTER, L. J.; DELIBERTO, T. J. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on postthaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 1898-1912, 2005.
- 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.
- NÖTHLING, J. O.; DOLIESLAGER, S. M. J.; FILLEKES, R.; COLLENBRANDER, B. Thawing dog spermatozoa in just-boiled water: Submersion time and effect on sperm quality compared to thawing in water at 70 °C. **Theriogenology**, v. 68, p. 530-537, 2007.
- PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 859-875, 2000.
- PLATZ, C. C.; SEAGER, S. W. J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Laboratory Animal Science**, v. 27, p. 1013-1016, 1977.
- SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.; OLIVEIRA, K. P. L.; VIEIRA, V. E.; GONDIM, J. M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl. 2, n. 5, p. 96-98, 2002.
- SAMPAIO-NETO, J. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J. F. Utilization of ACP 105® extender in the refrigeration of stallion semen. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v. 5, p. 137-139, 2002.
- 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**, v. 8, p. 75-80, 1998.
- SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina: main aspects for the accomplishment of artificial insemination in canine species. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, p. 33-40, 2003.
- SILVA, A. R.; FONTENELE-NETO, J. D.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M.; CHIRINÉA, V. H.; LOPES, M. D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p.595-601, abr./jun. 2009.
- SPITTALER, P. J.; TYLER, J. P. P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity of spermatozoal membrane. **Clinical Reproduction and Fertility**, v. 3, p. 187-190, 1985.
- THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENAES, A.; FOUGENER, J. A.; ANDERSEN BERG, K.; FARSTAD, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1645-1650, 2006.

Protocolado em: 22 nov. 2007. Aceito em: 21 set. 2010.