

USO DE DIMETIL-FORMAMIDA E ÁGUA DE COCO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO

THE USE OF DIMETHYL FORMAMIDE AND COCONUT WATER IN CANINE SEMEN CRYOPRESERVATION

Marina ZIMMERMANN^{1,2}; Tatiana Erhardt dos SANTOS²; Andrei Antonioni Guedes FIDELIS³; Hélio BLUME⁴; Rafael Gianella MONDADORI⁵

1. Médica Veterinária, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria -UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. Bolsista do CNPq; 2. Médica Veterinária, Pós-graduação Reprodução de cães e gatos, UPIS, Brasília – DF, Brasil; 3. Aluno da Faculdade de Medicina Veterinária da UPIS, Brasília – DF, Brasil; 4. Médico Veterinário, Doutor, Professor, UPIS, Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Reprodução Animal, Brasília – DF; 5. Médico Veterinário, Mestre, Professor, UPIS, Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Reprodução Animal, Brasília – DF. mondadori@upis.br.

RESUMO: O objetivo do presente experimento foi avaliar a eficácia de diferentes meios diluidores e crioprotetores na criopreservação do sêmen canino. O *pool* de sêmen utilizado no experimento foi elaborado a partir da segunda fração do sêmen coletado por manipulação digital de três cães SRD, com idade entre quatro e sete anos. A coleta foi realizada uma vez por semana, por seis semanas consecutivas, correspondendo, cada semana, a uma repetição do experimento. As frações do *pool* foram diluídas em 5 diferentes meios de congelação: (1) tris-gema com 6% de glicerol (TG6G); (2) tris-gema com 3,5% de dimetil-formamida (TG3,5DF); (3) tris-gema com 7% de dimetil-formamida (TG7DF); (4) tris-gema com 14% de dimetil-formamida (TG14DF) e (5) água de coco-gema com 6% de glicerol (ACG6G). A motilidade progressiva e o vigor do sêmen foram avaliados em três momentos distintos: logo após a formação do *pool*, após a diluição e resfriamento e após a descongelação. Os tratamentos que apresentaram menor motilidade progressiva foram TG3,5DF (26,8%), TG14DF (22,7%) e ACG6G (14,2%). O tratamento que obteve maior motilidade foi o TG6G (61,7%), seguido do TG7DF (46,7%). A análise da morfologia espermática revelou que, em média, os defeitos espermáticos aumentaram 22% entre o pré-resfriamento e o pós-descongelamento, não sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Mais estudos devem ser realizados, principalmente com concentrações de dimetil-formamida ao redor de 7%, utilizando-se outros testes de verificação de viabilidade espermática. O diluente água de coco-gema também deve ser submetido a outros experimentos com variações nos tipos e concentrações de crioprotetores.

PALAVRAS-CHAVE: Dimetil formamida. Água de côco. Criopreservação. Sêmen. Cão.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen canino está se tornando cada vez mais popular, já que permite o transporte de material genético tanto dentro do país como para o exterior. O interesse é múltiplo: clínico, econômico e zootécnico. A preservação de sêmen tem como objetivo a obtenção de índices de gestação após a inseminação artificial semelhantes aos obtidos com monta natural (QUINTANILHA, 1994) e, além disso, obter um melhor aproveitamento dos ejaculados. É importante observar também que as pesquisas em tecnologia de sêmen canino abrem a perspectiva de serem adaptadas à preservação de espécies canídeas ameaçadas de extinção (OLIVEIRA, 2003). A eficiência desta técnica está diretamente ligada à qualidade do sêmen e ao tipo de diluidor empregado.

A congelação e descongelação de espermatozoides provocam um choque térmico e

osmótico que diminui a porcentagem de espermatozoides móveis e a produção energética, também aumentando a permeabilidade da membrana celular (MORTON; BRUCE, 1989). Existem diferentes metodologias para a criopreservação de sêmen. As razões pelas quais um meio diluidor confere maior ou menor proteção aos espermatozoides devem-se ao fato de haver diferenças na composição da membrana espermática entre espécies, raças ou entre indivíduos da mesma espécie (HOLT, 2000). Por isso, apesar de existirem diluidores específicos para o sêmen canino (Biociphos[®]), novos estudos que testem tanto a eficiência quanto a qualidade e o baixo custo de novos diluidores devem ser realizados (SILVA, 1995).

No que se refere à água de coco (*Cocos nucifera*), não há um protocolo ideal para a conservação do sêmen canino, mas devido ao baixo custo e por apresentar uma riqueza de substâncias que participam no metabolismo do espermatozoide

(NUNES; SALGUEIRO, 1999), há um grande interesse em seu uso como meio diluidor, sendo utilizada para a diluição do sêmen de diversas espécies (OLIVEIRA et al., 1994; TONIOLLI et al., 1998; CARDOSO et al., 2000).

A água de coco como base de um diluidor para a congelação de sêmen canino, foi testada por CARDOSO et al. (2000), observando-se uma motilidade de 50% após a descongelação. A água de coco é estéril, ligeiramente ácida, contém proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento (fitormônios), fosfolipídio, além de outros compostos que possuem atividades semelhantes àquelas citocininas que são derivadas das purinas (difêniluréia), com excelentes atividades biológicas para as células (NUNES & SALGUEIRO, 1999). É necessário fazer a correção da osmolaridade (de 500mOsmol/L para 300-310 mOsmol/L) e do pH (de 4,5-5,0 para 6,2-6,6) da água de coco para haver compatibilidade desta com o sêmen canino (NUNES & COMBARNOUS, 1995).

A dimetil formamida, que vem sendo usada como crioprotetor de sêmen de várias espécies, como eqüinos (VIDAMENT et al., 2002), peixes, aves, inclusive caninos (OLIVEIRA, 2003), é um crioprotetor permeante, que atua por meio de suas propriedades coligativas, diminuindo o ponto crioscópico intracelular. Desta forma, maior quantidade de água vai permanecer no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos, proporcionando, assim, um ambiente menos deletério à célula espermática durante a congelação (WATSON, 1995).

Existem poucos estudos quanto a sua eficiência e principalmente quanto à concentração adequada a ser usada na criopreservação do sêmen de cão. Sabe-se que o crioprotetor é essencial para a congelação do sêmen, entretanto não permite a sobrevivência de 100% das células, o que se explica por possuir efeitos tóxicos, que dependem principalmente da concentração do crioprotetor usada e do tempo de exposição da célula ao mesmo (OLIVEIRA, 2003).

Este trabalho teve por objetivos testar diferentes meios, além de estabelecer a concentração de dimetil formamida capaz de proteger os espermatozóides causando o mínimo de efeitos deletérios. Com isso aprimorar a técnica de criopreservação do sêmen canino com o uso de diluidores mais completos e eficientes em relação aos atualmente utilizados na rotina dos laboratórios de reprodução canina.

MATERIAL E MÉTODOS

Como doadores de sêmen foram utilizados três cães, com idade entre 4 e 7 anos, sem raça definida. Os animais faziam parte do regime de coleta do Hospital e possuíam exame andrológico e clínico normais, comprovando estarem aptos a participar do experimento. Foram mantidos no canil do Hospital Veterinário da UPIS – Faculdades Integradas, com solário, durante todo o período de coleta do sêmen. Receberam ração comercial e água *ad libitum*.

Os cães foram coletados uma vez por semana, por meio de manipulação digital, utilizando-se apenas a segunda fração do sêmen, rica em espermatozóides. Foram realizadas seis coletas de cada cão. O ejaculado foi colhido com auxílio de um funil de plástico acoplado a um tubo de centrífuga de plástico graduado. As frações ricas dos ejaculados dos cães foram misturadas formando um *pool* de sêmen. Este foi acondicionado em caixa de isopor com água aquecida a 30°C durante o trajeto da sala de coleta ao laboratório. A coleta do sêmen foi realizada de forma padronizada: local, período do dia e pessoas presentes, durante todo o experimento.

No laboratório o tubo foi colocado em banho-maria a 30°C e mantido durante todo o processo de avaliação e diluição do sêmen, até o momento da sua refrigeração.

A análise macroscópica foi feita verificando objetivamente o volume, enquanto a cor, o odor e o aspecto avaliados subjetivamente.

Para a análise microscópica uma gota do *pool* de sêmen fresco foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecida em placa aquecedora a 37°C, avaliando-se o vigor espermático, numa escala de 0 a 5 e a motilidade espermática progressiva, expressa em porcentagem de 0 a 100, em microscópio óptico (100X e 400X). Para análise morfológica dos espermatozóides realizou-se um esfregaço antes da congelação, a partir do sêmen fresco, e após congelação/descongelação, sendo corados com Vermelho Congo. A concentração espermática foi determinada em câmara hematimétrica (câmara de Newbauer).

O *pool* foi dividido em cinco alíquotas de 1 mL e a cada uma dessas foi adicionado 0,5 mL do diluidor sem crioprotetor. As amostras foram refrigeradas por uma hora e meia até 4°C, bem como o crioprotetor em microtubo de 1,5 mL. Após a refrigeração, foi adicionado 0,5 mL do diluidor com crioprotetor contendo o dobro da concentração final pretendida de cada grupo.

As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL. Em seguida foram deixadas no vapor de nitrogênio por 15 minutos (-50 a -60°C) e após esse período mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido onde permaneceram por no mínimo uma semana.

Os grupos experimentais testados foram: (1) tris-gema com 6% de glicerol (TG6G); (2) tris-gema com 3,5% de dimetil-formamida (TG3,5DF); (3) tris-gema com 7% de dimetil-formamida (TG7DF); (4) tris-gema com 14% de dimetil-formamida (TG14DF) e (5) água de coco-gema com 6% de glicerol (ACG6G). Foi utilizada a proporção de 1 mL de diluidor para 1 mL de sêmen.

O meio tris-gema utilizado foi composto de 3,187 g de Tris (hidroximetil-amino metano), 1,781 g de Ácido Cítrico, 1,316 g Frutose, água destilada q.s.p. 80ml, 20 mL de gema de ovo, 1000 U.I. de penicilina e 1 mg de estreptomicina/mL de diluidor. Já, o meio de água de coco foi preparado à partir da diluição de duas partes de água de coco em uma parte de água bidestilada e deionizada. A esses meio base, foi adicionado o crioprotetor conforme o grupo experimental.

O descongelamento foi realizado com a palheta sendo deixada na água a 37°C por 1 minuto

e após avaliada a motilidade progressiva e o vigor do sêmen.

As coletas de sêmen foram realizadas por seis semanas consecutivas, sendo que cada semana foi considerada uma repetição do experimento. Os resultados de motilidade, vigor e morfologia espermática foram transformados por raiz quadrada para estabilizar o coeficiente de variação e avaliados por análise de variância. A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Duncan. As análises foram realizadas através do programa SAS Learning Edition 2.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Tabela 1, a motilidade progressiva e o vigor (1-5) do *pool* de sêmen foi de 86,7% e 4,8, respectivamente, mostrando que o sêmen submetido ao processamento apresentava boa qualidade. Além disso, o total de defeitos desse *pool* em nenhuma das repetições foi superior a 30%. Na mesma tabela observa-se uma queda na motilidade progressiva e no vigor, principalmente após o sêmen ter sido submetido ao congelamento e descongelamento. Essa injúria física também provocou um aumento do número de células com defeitos menores, principalmente cauda dobrada.

Tabela1: Valores de motilidade progressiva (%), vigor (1-5) e respectivos Desvios Padrão (DP), do sêmen canino, nos diferentes estágios de avaliação dos tratamentos.

	Fresco		Pós-resfriamento				Pós-descongelamento					
	Motilidade	DP	Vigor	DP	Motilidade	DP	Vigor	DP	Motilidade	DP	Vigor	DP
TG6G	86,7	13,3	4,8	0,4	84,2 ^a	9,2	4,5 ^a	0,5	61,7 ^a	29,3	4 ^a	1,3
TG3.5DF	86,7	13,3	4,8	0,4	84,2 ^a	4,9	4,7 ^a	0,5	26,8 ^b	21,4	2,5 ^b	0,1
TG7DF	86,7	13,3	4,8	0,4	77,5 ^a	16	4,3 ^a	0,5	46,7 ^{ab}	26	2,8 ^{ab}	0,1
TG14DF	86,7	13,3	4,8	0,4	80 ^a	12,2	4,5 ^a	0,8	22,7 ^b	18,7	2,7 ^{ab}	0,1
ACG6G	86,7	13,3	4,8	0,4	80 ^a	17,6	4,2 ^a	0,8	14,2 ^b	16,8	2,5 ^b	1,2

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05). Onde, TG6G= tris-gema com 6% de glicerol; TG3,5DF= tris-gema com 3,5% de dimetil-formamida; TG7DF= tris-gema com 7% de dimetil-formamida; TG14DF = tris-gema com 14% de dimetil-formamida; ACG6G= água de coco-gema com 6% de glicerol.

Analisando-se a motilidade progressiva e o vigor após o resfriamento do sêmen (Tabela 1) pode ser observado que todos os tratamentos se comportaram de maneira estatisticamente semelhante, mostrando que os crioprotetores, nas concentrações utilizadas, não apresentam toxicidade imediata para a célula espermática de caninos. Cabe também ressaltar que em todas as repetições realizadas a quantidade mínima de espermatozoides por palheta foi de 100 X 10⁶.

Após o descongelamento do sêmen, foi possível observar (Tabela 1) que os grupos que tiveram melhor desempenho em termos de

motilidade progressiva e vigor espermático foram o TG6G e TG7DF. Fica evidente que concentrações baixas – baixa eficiência crioprotetora – ou muito elevadas – aumento da toxicidade – de dimetil formamida não cumprem o papel necessário na congelação de sêmen, ou seja, manter a qualidade espermática.

O choque térmico que é provocado ao resfriar, congelar e descongelar os espermatozoides tem como conseqüências a diminuição da porcentagem de espermatozoides móveis e da produção energética, bem como o aumento da permeabilidade da membrana celular. As

perturbações estão essencialmente ligadas às mudanças osmóticas que provocam uma desidratação da célula e a formação de cristais no seu interior, principalmente de 15°C a -60°C (MORTON; BRUCE, 1989). Os grupos experimentais que tiveram a maior capacidade de manter a qualidade do sêmen foram TG6G e TG7DF, sendo próximo aos resultados encontrados por Medeiros et al. (2002), em experimento com sêmen de equino em que testaram diferentes meios com 5% de dimetil formamida.

A motilidade espermática progressiva ideal após o descongelamento deve ser superior a 50%, sendo que de 30 a 50% de espermatozoides móveis o sêmen ainda é considerado apto à fecundação (CONCANNON; BATISTA, 1989). Os diluidores TG3,5DF, TG14DF e ACG6G não foram eficientes na criopreservação do sêmen canino, apresentando média de motilidade progressiva inferior à média necessária após o descongelamento. No grupo TG3,5DF, esse fenômeno é evidenciado devido a baixa concentração do crioprotetor resultando em maiores danos ao espermatozoide durante o congelamento. O mesmo meio com maior concentração do crioprotetor (7%) mostrou-se eficiente, tendo média de motilidade progressiva superior aos 40%, semelhante ao resultado encontrado por Oliveira (2003), em que o crioprotetor DF a 5% no meio diluidor de lactose-gema apresentou potencial satisfatório. Já no grupo com 14% de dimetil formamida não foram obtidas médias satisfatórias para comprovar sua eficiência *in vitro*, o que pode ser explicado pela ação tóxica do crioprotetor sobre os espermatozoides, em doses elevadas.

O meio diluidor à base de água de coco, gema de ovo e glicerol, obteve índices baixos de motilidade e vigor no descongelamento, o que mostra ser ineficiente, nessas concentrações, para congelar o sêmen canino.

Segundo Oettlé (1993), a morfologia espermática apresenta correlação com a fertilidade, sendo que a porcentagem de espermatozoides normais menor que 60% diminui a fertilidade em 87%. Os defeitos totais não devem exceder 30 a 40% e os defeitos maiores não podem exceder os 10% do total de células espermáticas. Os defeitos encontrados na avaliação morfológica encontram-se na média satisfatória para o sêmen, não prejudicando o poder fecundante do mesmo.

CONCLUSÕES

Os meios diluidores tris-gema com 3,5% e 14% de dimetil formamida e água de coco com 6% de glicerol não devem ser usados na criopreservação do sêmen canino.

Os meios tris-gema 6% de glicerol e tris-gema 7% de dimetil formamida tiveram maior capacidade de preservar a qualidade do sêmen, sendo indicados à criopreservação do sêmen canino.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UPIS – Faculdades Integradas pelo suporte financeiro e à Professora Eliandra Maria Bianchini Oliveira pelo apoio na análise estatística.

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate the efficacy of different extenders and cryoprotectants in canine semen cryopreservation. The semen pool used in the experiment was obtained from second fraction of semen collected by digital manipulation from three mixed breed dogs aged from four to seven years, maintained at UPIS University. Semen collection was performed once a week, during six weeks. Each week corresponded to one experiment repetition. The semen pool was divided in five fractions in order to be extended in one of the following freezing media: (1) tris-egg yolk with 6% of glycerol (TEY6G); tris-egg yolk with 3.5% of dimethyl formamide (TEY3.5DF); tris-egg yolk with 7% of dimethyl formamide (TEY7DF); tris-egg yolk with 14% of dimethyl formamide (TEY14DF) and; coconut water-egg yolk with 6% of glycerol (CWEY6G). The semen progressive motility and vigor were evaluated in three different moments: just after the pool formation, after the dilution and chilling and after thawing. The treatments which showed a more pronounced drop in progressive motility (73%) were TEY3.5DF, TEY14DF and CWEY6G, followed by TEY7DF (46%), which differed from TEY6G treatment, that showed the lowest fall (29%). By the analysis of sperm morphology, it was observed that all the treatments showed a similar increase (22%) in the number of defective cells between the pre-chilling and post-thawing ($p>0.05$). The results showed that more studies must be performed, mainly with dimethyl formamide concentrations around 7%, using other methods in order to verify sperm viability. Also, the coconut water extender must be submitted to other challenges with different cryoprotectants and concentrations.

KEYWORDS: Dimethyl formamide. Coconut water. Cryopreservation. Sêmen. Dog.

REFERÊNCIAS

- CARDOSO, R. C. S. et al. Congelação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. **Ciência Animal**, Goiás, v. 10, p. 29-36, 2000.
- CONCANNON, P. W.; BATISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK. **Current veterinary therapy – small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1989. Cap. 9, p. 1247-1259.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Montgomery, v. 53, p. 47-58, 2000.
- MEDEIROS, A. S. L et al. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, Montgomery, v. 58, p. 273-276, 2002.
- MORTON, D. B.; BRUCE, S. G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 39, p. 311-316, 1989.
- NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1, 1995, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza:UECE, 1995. p. 53-63.
- NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, Fortaleza, v. 1, p. 17-26, 1999.
- OETLLÉ, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 47, p. 257-260, 1993.
- OLIVEIRA, L. F. et al. Água de coco in natura adicionada ou não de gema de ovo e sob a forma estabilizada de gel como diluidor do sêmen ovino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Olinda. **Anais...**Olinda: CBMV, 1994. p. 561. Resumo.
- OLIVEIRA, S. C. E. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino**. 2003, 60f. Dissertação (Mestrado em Reprodução) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- QUINTANILHA, A. M. P. N. Inseminação artificial e sêmen congelado. In: NELSON, R. W.; COUTO, C.G. **Fundamentos de medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Roca, 1994. Cap. 12, p. 526-529.
- SILVA, L. D. M. **Procréation médicalement assistée dans l'espèce canine – Investigations morpho-fonctionnelles et optimisation des techniques permettant d'arriver à la maîtrise de la reproduction**. 1995. 173f. Tese (Doutorado em Reprodução animal) - Universidade de Liège, Bélgica.
- TONIOLLI, R. et al. Avaliação *in vitro* do sêmen de suíno diluído em BTS e na água de coco *in natura* e estabilizada e com BTS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 22, n. 2, p. 198-201, 1998.
- VIDAMENT, M. et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, Montgomery, v. 58, p. 249-251, 2002.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, New York, v. 7, n.4, p. 871-891, 1995.