

EFEITO DE DOIS DILUIDORES NO SÊMEN CANINO APÓS DESCONGELAMENTO

FERNANDA RODRIGUES MENDONÇA¹; EDENARA ANASTÁCIO DA SILVA²,
MARINA ZANIN³, CLEDERSON IDENIO SCHIMITT⁴, ANTÔNIO SÉRGIO VARELA
JÚNIOR⁵, CARINE CORCINI DAHL⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – nandarm.vet@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – edenara_anastaco@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Rio Grande – mariinazanin@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – schmittproducoes@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Rio Grande – varelajras@gmail.com*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O primeiro relato positivo do uso de sêmen congelado canino para inseminação artificial foi publicado em 1954 (HARROP, 1954). Depois disso o mercado para a utilização de sêmen canino para reprodução assistida (RA) cresceu bastante (GOERICKE-PESCH, 2012) possuindo como interesses: clínico, econômico, zootécnico, afetivo e ambiental, uma vez que as técnicas utilizadas para caninos domésticos podem ser extrapoladas para conservação de canídeos silvestres (OLIVEIRA, 2003).

As tecnologias de preservação do sêmen são extremamente importantes na RA. Esses técnicas tornam possível que se armazene o sêmen por dias (resfriamento) e até anos (congelamento), sendo que o grau sucesso está intimamente interligado com a utilização de crioprotetores e diluidores adequados (RODENAS 2014), pois é um processo estressante para a célula, provocando choque térmico e osmótico, que geram dano ao espermatozoide, estimulam a apoptose celular e diminuem a porcentagem de espermatozoides móveis (AGARWAL, 2014). Ou seja, criopreservação é sinônimo de crioinjúria devido à formação de cristais de gelo e à alta pressão osmótica, que fazem com que ocorra uma perda de função espermática bastante insatisfatória no descongelamento (JIN, 2016), se fazendo necessária a utilização de produtos adequados para a espécie de forma a minimizar os resultados negativos da técnica. Alguns crioprotetores e diluentes que são de origem animal, como por exemplo o TRIS gema, tem um resultado excelente, porém são fontes potenciais de contaminação que podem reduzir a fertilidade dos espermatozoides e transmitir doenças e por isso alternativas mais viáveis e seguras são procuradas (BOUSSEAU, 1998).

Além disso, outro fator que complica o sucesso das tecnologias de RA é o fato de que normalmente os reprodutores são escolhidos devido à uma (ou mais) característica (s) fenotípica(s) e não necessariamente devido à características genotípicas ou qualidade seminal, sendo que pouca atenção se prestou à heritabilidade da fertilidade, muitas vezes esta sendo completamente ignorada como por exemplo no caso do reprodutor apresentar excelentes características da raça e for ganhador de diversos prêmios (ENGLAND, 2010).

Tendo em vista o mau congelamento/resfriamento de alguns reprodutores e do risco que os diluentes e crioprotetores de origem animal representam, foi-se proposto testar a viabilidade de um diluente comercial (Botudog TURBO ®) como alternativa no descongelamento do sêmen canino em comparação ao TRIS gema.

2. METODOLOGIA

Coletou-se a porção rica do sêmen de cinco cães adultos de raças variadas através da técnica de estimulação digital. Foi avaliada se a motilidade era igual ou superior à 80%, sendo diluído com Tris-gema (2,4g TRIS; 1,4g ácido cítrico; 0,8g glicose; q.s.p 100mL de água para injeção; 20% de gema de ívi; pH 6,86), com diluição igual a 200×10^6 espermatozoides/mL. Foi, então, refrigerado à 4°C durante uma hora e após foram rediluídas (1:1) com glicerol estabilizado à mesma temperatura. Após novo período de estabilização, 15 minutos, as amostras foram acondicionadas em paletas de 0,25mL e posicionadas 6 cm acima do vapor de nitrogênio líquido por 10 minutos, sendo depois submersas neste, permanecendo imersas em nitrogênio líquido durante algumas semanas.

O primeiro diluente (controle) foi TRIS gema, preparado da mesma forma que foi descrito anteriormente. O segundo diluente foi comercial (Botudog TURBO ®) e foi preparado de acordo com a orientação do fabricante. Cada diluente foi separando cinco alíquotas de 100µL e cada alíquota foi acondicionada em um tubo ependorf de 0,5mL, sendo mantidos em placa aquecida à 37°C durante 10 minutos para estabilização. Após este tempo, as paletas foram descongeladas cuidadosamente em banho-maria à 37 °C durante 30 segundos, sendo dividido em duas frações de 50 µL, uma para o grupo controle (TRIS gema) e a outra para o grupo tratamento (Botudog TURBO ®). Sempre mantidas na placa aquecida, foram avaliadas através do sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis Sperm Version® 3.5 – Minitub, Tiefenbach, Germany), conforme proposto por Iguer-Ouada et al (2001), com 10 minutos, 30 minutos, uma hora e duas horas após o descongelamento. Os dados foram analisados através do sistema ANOVA para variância, sendo o $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além do uso de substâncias crioprotetoras de forma a minimizar a quantidade de dano que a célula espermática sofre, é bastante comum a utilização de substâncias após o descongelamento ou após um resfriamento longo de forma a aumentar os níveis de energia do espermatozoide, como é o caso da cafeína. A gema de ovo foi escolhida como controle por ser um crioprotetor não penetrante que serve como fonte externa de energia, pois é rica em gordura, proteína, sendo a parte mais calórica do ovo e responsável pelo sustento do pinto, possuindo diversos estudos que provam sua eficácia (WATSON, 1981).

Foi possível notar uma grande diferença de ação em ambos os diluentes. Enquanto o diluente controle parece ter agido de forma mais imediata (Figura 1), melhorando a qualidade e a movimentação espermática durante a primeira hora, quando esta começou a decair.

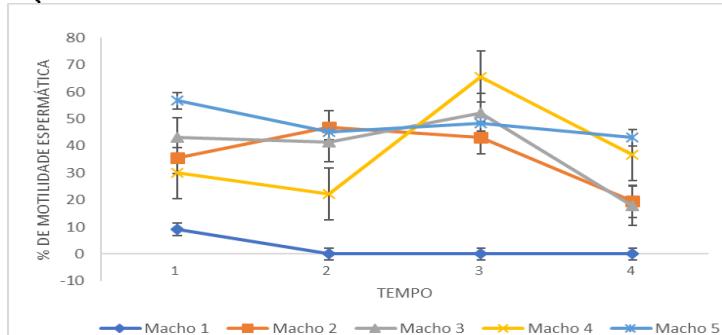


Figura 1: análise de motilidade espermática de cinco machos no grupo controle (TRIS gema) em quatro períodos de tempo - 10 minutos (1), 30 minutos (2), 1 hora (3) e 2 horas (4).

O diluente 2 teve uma ação mais tardia, começando a melhorar a movimentação espermática após uma hora, como pode ser conferido na Figura 2. Além disso, manteve vivo durante maior tempo os espermatozoides do macho 1, que descongelou de maneira bastante pobre.

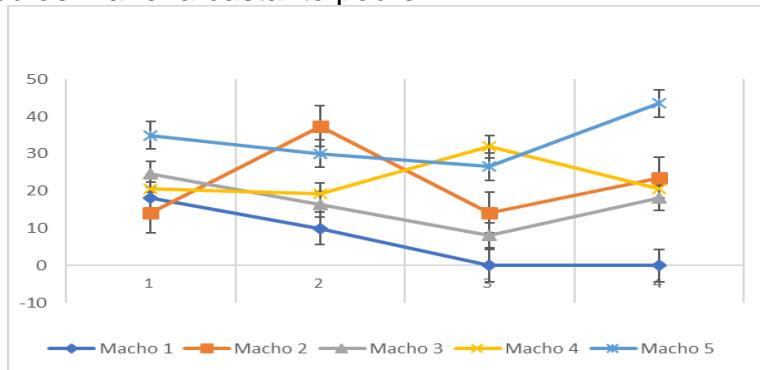


Figura 2: análise de motilidade espermática de cinco machos no grupo tratamento (Botudog TURBO ®) em quatro períodos de tempo - 10 minutos (1), 30 minutos (2), 1 hora (3) e 2 horas (4).

Pode-se supor que o diluente 2 talvez precisasse de um maior tempo para a estabilização ou que possua mecanismo de ação mais lento, devido às grandes moléculas de caseína presentes, mas o fato é que ele cumpriu a promessa de melhorar a qualidade e a duração de amostras menos viáveis. Além disso, sabe-se que dentro da espécie canina existe uma grande variação individual com relação à resistência ao frio e à maneira como essas células reagem aos crioprotetores e diluentes. O que pode justificar as diferenças em motilidade entre indivíduos dentro de um mesmo tratamento. Além disso, existem outros fatores que influenciam na qualidade seminal e na habilidade de fazer um bom descongelamento, como por exemplo a idade, normalmente correlacionada à uma produção menor de testosterona, tanto em animais mais velhos como mais novos (FUENTE-LARA, 2019). Este fato já foi reportado também em outras espécies, como humanos (SLOTER, 2006) e garanhões (DOWSETT, 1996).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se, portanto, que ambos os diluentes funcionaram da maneira esperada ao aumentarem a motilidade espermática das amostras, porém um de maneira mais tardia e que apesar dos riscos apresentados, o diluente e crio protetor TRIS gema continua sendo uma alternativa viável para a utilização em animais que descongelam bem ou onde a inseminação acontecerá rapidamente após o descongelamento. Propõe-se que o segundo seja utilizado em amostras de menor qualidade e além disso, propõe-se a necessidade de um maior tempo de incubação antes da utilização do diluente comercial, sendo necessários maiores estudos na área a fim de encontrar alternativas viáveis de diluidores espermáticos que aumentem de fato a qualidade das alíquotas descongeladas ou que as mantenham viáveis durante mais tempo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL A., G. Virk, C. Ong, et al., Effect of oxidative stress on male reproduction, **World J. Men's Health**, 1e17, 2014.
- BOUSSEAU S, Brillard JP, Marguant-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology** 50(5):699–706, 1998.
- DOWSETT KF, Knott LM. The influence of age and breed on stallion semen. **Theriogenology**, 46:397-412, 1996.
- ENGLAND, G.C.W., L. Phillipsb,c, S.L. Freemana Heritability of semen characteristics in dogs, **Theriogenology**, 74, 1136 –1140, 2010.
- FUENTE-LARA, A., Hesser A., Christensen B., Gonzales K, Meyers S., Effects from aging on semen quality of fresh and cryopreserved semen in Labrador Retrievers **Theriogenology** 132 164e171, 2019. JIN
- GOERICKE-PESCH S, Klaus D, Failing K, Wehrend A. Longevity of chilled semen comparing different extenders. **Anim Reprod Sci** ;135:97–105, 2012
- HARROP AE. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. **Br Vet J**;110:424–5, 1954.
- IGUER-OUADA M, Verstegen JP. Evaluation of the “Hamilton Thorn Computer-Based Automated System” for dog semen analysis. **Theriogenology**;55:733–49, 2001.
- JIN, J.X., S. Lee, C. Khoirinaya, et al., Supplementation with spermine during in vitro maturation of porcine oocytes improves early embryonic development after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer, **J. Anim. Sci.**, 94 963-970, 2016.
- 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.
- RODENAS C., Parrilla I., Roca J., Martinez E. A., Lucas X. Quality of chilled and cold-stored (5 °C) canine spermatozoa submitted to different rapid cooling rates **Theriogenology** 82 621–626, 2014.
- SLOTER E., Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ. Quantitative effects of male age on sperm motion. **Hum Reprod**, 21:2868-75, 2006
- WATSON PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein, **J Reprod Fertil**, Jul;62(2):483-92, 1981.