

## CONSERVAÇÃO DA CAPACIDADE LIGANTE DE ESPERMATOZOIDES CANINOS REFRIGERADOS EM DILUENTE TRIS-GEMA

*(Conservation of the binding ability of chilled canine sperm in Tris-egg yolk extender)*

Thales Pinheiro CAVALCANTI<sup>1\*</sup>; Ana Glória PEREIRA<sup>2</sup>; Luana Grasielle Pereira  
BEZERRA<sup>2</sup>; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA<sup>2</sup>; Andreia Maria  
da SILVA<sup>2</sup>; Alexandre Rodrigues SILVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Av. Washington Soares, 1321. Edson Queiroz, Fortaleza/CE.  
CEP: 60.811-905; <sup>2</sup>Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal  
Rural do Semi-Árido (UFERSA). \*E mail: [thalescavalcanti@edu.unifor.br](mailto:thalescavalcanti@edu.unifor.br)

### ABSTRACT

The aim was to evaluate the efficiency of the Tris-egg yolk extender in conserving the binding capability of canine sperm chilled for up to 48 h. The semen of four dogs was collected by digital manipulation and evaluated. The sperm fractions were diluted in Tris-egg yolk and stored at 4 °C. The sperm parameters of motility, vigor, morphology and osmotic response were evaluated in fresh semen, immediately after dilution (0h), at 24h and at 48h. The sperm binding test using the chicken egg's perivitelline membrane was performed on fresh and 48 h-chilled samples. As a result, fresh semen showed motility of 99.2±0.8%, vigor 5±0,1 with 84.2±1.8% morphologically normal sperm, 95.0±0.8% osmotic response and 302.3±27.0 membrane-bound sperm. After refrigeration for 48 h, a significant reduction (p<0.05) in the sperm parameters was observed however, values were within the ideal range for the use of semen, such as 90.8±1.5% mobile sperm, with vigor 4.3±0.2, normal morphology of 71.5±1.9%, osmotic response of 77.0±4.1%, and 205.5±27.7 bound sperm. In conclusion, the hen egg perivitelline membrane binding test proved the efficiency of the Tris-egg yolk extender in conserving the binding capability of canine sperm chilled for 48h.

**Key Words:** Semen, dogs, artificial insemination, conservation.

### INTRODUÇÃO

Os cães, além de se tornarem membros da família, desempenham funções de trabalho de acordo com habilidades específicas preservadas ao longo de centenas de anos. Assim, um grande número de raças surgiu, despertando interesse por parte dos criadores em aprimorá-las por meio do uso de técnicas de reprodução assistida (SILVA *et al.*, 2019).

Dentre essas, destaca-se a inseminação artificial com sêmen refrigerado (Mota-FILHO *et al.*, 2007), que possibilita a difusão do material genético, atravessando fronteiras, mantendo a capacidade fecundante dos espermatozoides. Porém, a refrigeração pode prejudicar a célula espermática levando à perda de sua viabilidade (JOHNSTON *et al.*, 2001), tendo como consequência a redução de sua capacidade de interação com o ovócito.

A avaliação desses danos torna-se essencial para o estabelecimento de protocolos de maior eficiência para a refrigeração de sêmen canino. Neste sentido, o teste de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha surge como alternativa para a avaliação funcional do espermatozoide do cão (BRITO *et al.*, 2017), conforme já estabelecido em outras espécies (CASTELO *et al.*, 2015). Este teste se baseia na similaridade entre glicoproteínas da zona pelúcida dos ovócitos mamíferos e as proteínas da referida membrana (TAKEUCHI *et al.*, 1999). Assim, ele permite uma estimativa do potencial de fertilidade de amostras espermáticas, possibilitando a avaliação de protocolos de diluição e conservação de sêmen (CASTELO *et al.*,

2015). Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência do diluente Tris-gema em conservar a capacidade ligante do espermatozoide canino durante a refrigeração por até 48 h.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais experimentais

Utilizaram-se quatro cães machos adultos da raça Buldogue Francês, com idades de  $3,5 \pm 0,7$  anos, pesando em torno de 12kg. Os cães foram oriundos de um canil particular localizado em Mossoró/RN, Brasil, sendo mantidos em baias, alimentados de ração comercial e com livre acesso a água. Para o experimento, os animais foram previamente selecionados por meio de exame clínico e avaliação andrológica.

### Coleta e avaliação do sêmen

Dois cães foram coletados em duas ocasiões, enquanto os demais em apenas uma, totalizando seis ejaculados. Os animais foram coletados por manipulação digital peniana, sendo o ejaculado separado em suas três frações (JOHNSTON *et al.*, 2001). A fração espermática de cada cão foi avaliada quanto a sua coloração e volume. A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer. Procedeu-se a avaliação microscópica (x400) da motilidade (%) e do vigor (0 – 5) espermáticos. Foram confeccionados esfregaços de sêmen corados em Rosa Bengala para análise da morfologia, tendo sido contadas 200 células por amostra sob microscopia (x1000) (Mota-Filho *et al.*, 2007). Para avaliação da integridade funcional de membrana espermática, observou-se a resposta osmótica por meio do teste hiposmótico, utilizando água destilada (0 mOsm/L) a 38 °C por 30 minutos. Procedeu-se a contagem de 200 células sob microscopia (x400) considerando-se com reposta funcional aquelas que apresentavam encurvamento e edemaciação de cauda (QUINTELA *et al.*, 2010).

### Teste de ligação espermática

Foram utilizados ovos de galinha frescos e não fertilizados, cujas membranas foram obtidas mediante separação da gema e do albúmen. As membranas perivitelinas foram lavadas em solução salina (NaCl, 0,9%), e submetidas a cortes de 1cm<sup>2</sup>. Para cada amostra foram destinadas duas membranas. Paralelamente, as amostras espermáticas foram diluídas em meio de incubação (1:1) conforme descrito por Castelo *et al.* (2015), e centrifugadas a 700x g durante 10 minutos. O pellet foi re-diluído obtendo-se uma concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Cada membrana foi mantida em placas de quatro poços contendo meio de incubação, em banho maria a 38,5 °C por 20min. Em seguida, foram lavadas em 100µL de meio de incubação, para a remoção de espermatozoides frouxamente ligados, e então incubadas por mais 15min com Hoechst 33358 (10µg/mL). Por fim, as membranas foram estiradas em lâmina com lamínula e avaliadas em microscopia de epifluorescência (x400 – Episcopic Fluorescent attachment “EFA” Halogen Lamp Set. Leica. Kista. Suécia) quanto ao número de espermatozoides ligados em seis diferentes campos (CASTELO *et al.*, 2015).

### Processamento do sêmen

Após a coleta, as frações espermáticas foram diluídas em uma solução constituída por 3,028g de Tris-hidroximetil-aminometano, 1,78g de ácido cítrico mono-hidratado, e 1,25g de frutose, diluídos em 100mL de água destilada. O diluente foi acrescido de 20% de gema de ovo (MOTA-FILHO *et al.*, 2007) e 70µg/mL de gentamicina. As amostras foram armazenadas em incubadora biológica a 4 °C. Os parâmetros espermáticos de motilidade, vigor, morfologia e resposta osmótica foram avaliados conforme previamente descritos após a diluição (0 h), as 24 e as 48h. O teste de ligação a membrana perivitelina do ovo de galinha foi realizado nas amostras a fresco e nas conservadas sob refrigeração por 48h.

### Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e erro padrão (EP) e analisados pelo programa Statview 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NY, USA). O efeito do tempo de conservação sobre os parâmetros espermáticos foi verificado por ANOVA para medidas repetidas, exceto para o vigor que foi avaliado pelo teste de Mann-Whitney à um intervalo de confiança de 5% (p<0,05).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações espermáticas apresentaram coloração branco-opalescente, volume de 1,4±0,3mL, com concentração de 546,7±59,5 milhões de espermatozoides/mL. Os parâmetros espermáticos no sêmen fresco (Tab. 01) dos cães utilizados no experimento estavam dentro da normalidade descrita para a espécie (JOHNSTON *et al.*, 2001). A diluição não provocou danos aos espermatozoides, exceto na morfologia (Tab. 01). Apesar disso, os valores para morfologia espermática mantiveram-se dentro da faixa aceitável (JOHNSTON *et al.*, 2001) durante todo o processo. Já a motilidade, que é o principal parâmetro avaliado em uma amostra de sêmen (DOMOSŁAWSKA *et al.*, 2019), manteve-se em valores aceitáveis durante as 48h, assim como o vigor e a resposta osmótica (Tab. 01).

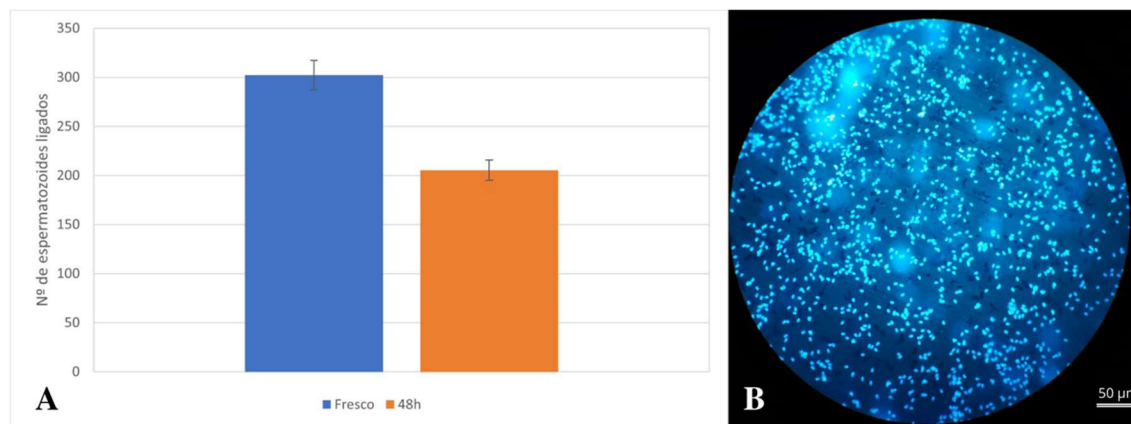
**Tabela 01:** Valores médios (±EP) dos parâmetros espermáticos no sêmen canino fresco, diluído (0h) e refrigerado por 24 e 48h, utilizando o diluente Tris-gema (n=6).

Parâmetros	À fresco	0h	24h	48h
Motilidade (%)	99,2±0,8 <sup>a</sup>	96,3±1,6 <sup>ab</sup>	97,0±1,4 <sup>ab</sup>	90,8±1,5 <sup>b</sup>
Vigor (0 – 5)	5±0 <sup>a</sup>	5±0 <sup>a</sup>	4,8±0,1 <sup>a</sup>	4,3±0,2 <sup>b</sup>
Morfologia (%)	84,2±1,8 <sup>a</sup>	84,5±2,5 <sup>a</sup>	81,5±2,0 <sup>b</sup>	71,5±1,9 <sup>c</sup>
Resposta osmótica (%)	95,0±0,8 <sup>a</sup>	90,3±1,3 <sup>b</sup>	83,7±1,8 <sup>c</sup>	77,0±4,1 <sup>d</sup>

<sup>abcd</sup> Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística significativa (P < 0,05).

A refrigeração promoveu redução significativa no número de espermatozoides ligados (Fig. 01), sendo obtidos valores de 302,3±27,0 no sêmen fresco e 205,5±27,7 no sêmen refrigerado por 48 h. Entretanto, ressalta-se que a refrigeração em diluente Tris-gema foi eficiente ao ponto de permitir a manutenção da capacidade ligante em cerca de 70% dos

espermatozoides. Além disso, os valores obtidos neste estudo, tanto para o sêmen fresco quanto para o refrigerado, são superiores aos previamente descritos para a espécie, com uso do sêmen fresco (Brito *et al.*, 2017). Finalmente, ressalta-se que este é, ao nosso conhecimento, o primeiro estudo a aplicar o referido teste para a análise da capacidade ligante em sêmen canino mantido sob refrigeração.



**Figura 01:** Histograma (A) e micrografia de epifluorescência (B) representando o número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina da gema do ovo da galinha no sêmen canino fresco e refrigerado por 48h.

## CONCLUSÕES

O teste de ligação de membrana perivitelina do ovo de galinha comprovou a eficiência do diluente Tris-gema em conservar a capacidade ligante de espermatozoides caninos refrigerados por 48h.

## REFERÊNCIAS

- BRITO, M.M.; LOSANO, J.D.A.; AGRIMANI, D.S.R.; LÚCIO, C.F.; DALMAZZO, A.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C.I. Sperm-binding to the perivitelline membrane of chicken egg yolk as a functional test for sperm evaluation in dogs. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.54, n.4, p.366–374, 2017.
- CASTELO, T.S.; SILVA, A.M.; BEZERRA, L.G.; COSTA, C.Y.; LAGO, A.E.; BEZERRA, J.A.; CAMPOS, L.B.; PRAXEDES, E.C.; SILVA, A.R. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). *Cryobiology*, v.71, p.442–447, 2015.
- DOMOSŁAWSKA, A.; ZDUŃCZYK, S.; JANOWSKI, T. Improvement of Sperm Motility Within One Month Under Selenium and Vitamin E Supplementation in Four Infertile Dogs with Low Selenium Status. *Journal of Veterinary Research*, v.63, n.2, p.293–297, 2019.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: W.B.Saunders, 2001. 592p.

MOTA-FILHO, A.C.; CASTELO, T.S.; COSTA L.L.M.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R. Conservação do sêmen canino sob refrigeração em diferentes caixas isotérmicas. *Acta Veterinaria Brasília*, v.1, n.3, p.78–83, 2007.

QUINTELA, A.T.; OLIVEIRA, I.R.S.; SOUZA, A.O.; GUSMÃO, A.L.; SILVA, A.R. Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. *Animal Reproduction*, v.7, n.2, p.70–74, 2010.

SILVA, A.R.; MOTA-FILHO, A.C.; VIANA, F.A.B. Cinofilia, uma breve introdução. In: LUZ, M.R.; SILVA, A.R. *Reprodução de cães*. 1ª ed., São Paulo: Manole, p.12-28, 2019.

TAKEUCHI, Y.; NISHIMURA, K.; AOKI, K.; ADACHI, T.; SATO, C.; KITAJIMA, K.; MATSUDA, T. A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC Family glycoproteins in mammalian zona pellucida. *European Journal of Biochemistry*. v.260, p.736–742, 1999.