

Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães *Updates on canine semen cryopreservation*

Alexandre R. Silva

Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), CEP 59650-900, Mossoró, RN, Brasil

Correspondência: legio2000@yahoo.com

Resumo

A possibilidade de utilização do sêmen canino criopreservado abriu diversas fronteiras para a criação de cães, permitindo a troca de material genético de alto valor entre regiões distantes e o armazenamento desse material por períodos indefinidos. O presente trabalho apresenta uma revisão científica sobre os diversos fatores ligados à criopreservação do sêmen de cães, com especial atenção aos resultados das pesquisas mais recentes neste assunto. Inicialmente, são abordados os meios utilizados como diluentes do sêmen canino, com principal enfoque para o tampão Tris associado à gema de ovo e ao glicerol. Em seguida, os principais métodos de diluição, envase, criopreservação e descongelação utilizados para o sêmen canino são abordados.

Palavras-chave: cão, sêmen, criopreservação.

Abstract

The possibility for the use of frozen canine semen had opened several frontiers for canine breeding, since it allows the exchange of valorous genetic material among distant regions, as well as the storage of that material for undefined periods. This study presents a scientific review about canine semen cryopreservation, with special attention for the results from most recent researches in this subject. First, the media used as extenders for canine semen are cited, with main focus for the Tris-buffer plus egg yolk and glycerol. Then, the main methods of dilution, package, cryopreservation and thaw used for canine semen are reviewed.

Keywords: dog, semen, cryopreservation.

Introdução

Dentre todas as biotécnicas reprodutivas, aquela que, atualmente, oferece os maiores subsídios para difusão de material genético na criação de cães é, sem dúvidas, a inseminação artificial em intrínseca associação à tecnologia de sêmen. A possibilidade de utilização do sêmen canino criopreservado abriu diversas fronteiras para a criação de cães, permitindo a troca de material genético de alto valor zootécnico entre localidades distantes e o armazenamento desse material por períodos indefinidos (Silva, 2005).

Apesar de os primeiros estudos relacionados à inseminação artificial (IA) e conservação de sêmen terem sido desenvolvidos na espécie canina por Lázaro Spallanzani, ao final do século XVIII (England, 1993), os estudos posteriores se concentraram, principalmente, na reprodução daqueles animais que tinham um interesse produtivo para o homem, como bovinos, pequenos ruminantes e suínos. Após um longo vazio científico, em 1969, Seager obteve a primeira gestação canina, utilizando o sêmen criopreservado. Desde então, inúmeros estudos relacionados à reprodução canina têm sido conduzidos e, particularmente, nas últimas duas décadas, tem crescido o interesse nessa espécie. Esse maior interesse recente pode ser atribuído, principalmente, a uma mudança conceitual dentro da medicina veterinária, na qual a necessidade de especialização em determinadas áreas tem aumentado a cada dia, haja vista uma maior requisição dos criadores de cães quanto a serviços especializados direcionados para seus animais de alto valor zootécnico ou afetivo.

O presente trabalho apresenta uma revisão científica sobre os diversos fatores ligados à criopreservação do sêmen de cães, com especial atenção aos resultados das pesquisas mais recentes neste assunto.

Diluentes

O sêmen apropriadamente diluído pode ser congelado por tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante quando reaquecido e utilizado em uma IA. Um bom diluente de sêmen deve conter nutrientes, servir como tampão ajustando as alterações do pH, promover uma pressão osmótica e concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos, proteger as células contra o choque térmico durante o processo de

resfriamento e possuir crioprotetores que reduzam os danos às células espermáticas durante a congelação e posterior descongelação (Concannon e Battista, 1989).

Os primeiros experimentos para a preservação do sêmen canino iniciaram-se com a adaptação empírica de diluentes usados para o resfriamento e congelação do sêmen bovino com o uso dos tampões à base de citrato (Harrop, 1962), leite desnatado (Martin, 1963); cloreto de fosfato (Wales e White, 1963), Tris (Foote, 1964) e lactose (Seager, 1969). Na atualidade, o Tris permanece como o diluente mais utilizado por diferentes grupos de pesquisa (Rota *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006c).

O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano - $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Ele permanece estável em temperatura ambiente por diversos meses, atuando como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (McPhail e Goodman, 1984).

A atividade metabólica do espermatozóide resulta na formação de íons H^+ , que poderiam acidificar o meio. Faz-se necessário um mecanismo para a remoção desses íons, visto que a diminuição de pH poderia reduzir a longevidade e a capacidade fertilizante da célula espermática. Davis *et al.* (1963) foram os primeiros a descrever a utilização do tampão Tris para a conservação do sêmen de um mamífero, no caso, da espécie bovina. No ano seguinte, Foote (1964) adaptou o uso do diluente à base de tampão Tris associado ao citrato para a preservação do sêmen na espécie canina. Desde então, o Tris tornou-se o diluente mais utilizado para a congelação do sêmen canino. De fato, o Tris não apenas apresenta atividade tamponante, mas também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação de sua energia (Rodrigues, 1997).

Para o preparo do diluente Tris, usualmente, realiza-se a adição de uma hexose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), como uma fonte exógena de substrato energético para o espermatozóide (England, 1993). A célula espermática dos mamíferos é capaz de obter a energia necessária para a manutenção de sua motilidade através da via glicolítica ou do ciclo de Krebs (Rigau *et al.*, 2002). O plasma seminal da espécie canina, normalmente, não possui grandes quantidades dos açúcares frutose e glicose (Rigau *et al.*, 2001). Rigau *et al.* (2001) demonstraram que esses açúcares atuam em mecanismos diferentes na célula espermática, sendo que a frutose lhe confere uma motilidade mais rápida e linear. Posteriormente, os mesmos autores (Rigau *et al.*, 2002) demonstraram que a frutose é mais sensível à atividade da enzima hexoquinase, apresentando um efeito mais significativo sobre o metabolismo da célula espermática, quando comparada à glicose.

Silva *et al.* (2002b) congelaram o sêmen de cães na ausência de glicerol ou gema de ovo, utilizando um diluente formado apenas por Tris-frutose-ácido cítrico, e demonstraram que 11% dos espermatozoides foram capazes de apresentar motilidade após a descongelação. A sobrevivência desses espermatozoides pode ser atribuída a uma ação crioprotetora da frutose, e possivelmente o aumento de sua concentração no meio poderia levar a melhores resultados pós-descongelação.

O ácido cítrico (ácido 2-hidrox-1,2,3-propanotricarboxílico - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) é um ácido fraco inorgânico, facilmente encontrado nos frutos cítricos, que também entra na composição do diluente Tris (Silva *et al.*, 2002b). Em temperatura ambiente, apresenta-se como um pó cristalino branco, podendo existir na forma anidra ou na monohidratada. É provável que o ácido cítrico contribua para a preservação da célula espermática auxiliando na manutenção do pH do diluente e atuando como anti-oxidante, bem como no mecanismo de respiração celular (Silva, 2005).

Uma variedade de companhias comerciais tem desenvolvido seus próprios diluentes. Silva e Verstegen (1995) realizaram inseminações artificiais com sêmen canino congelado tanto em uma mistura dos tampões Tes/Tris, quanto com os diluentes comerciais Laiciphos 478 e Biociphos W482 (IMV, France), tendo sido este último especialmente desenvolvido para a congelação do sêmen na espécie canina. Esses autores obtiveram uma taxa de concepção de 60% com o Laiciphos e a mistura de Tes/Tris, enquanto que com o uso do Biociphos obtiveram 100% de concepção.

O Triladyl (Minitub, Tiefenbach, Alemanha) é um diluente comercial composto por Tris, ácido cítrico, frutose, glicerol, gentamicina, espectinomicina e lincomicina (Nothling *et al.*, 1995). Um outro meio comercial bastante utilizado e que vem proporcionando excelentes resultados *in vitro* e *in vivo* é o diluidor produzido pelo Cryogenic Laboratories of New England, Inc. - CLONE (Strom *et al.*, 1997). A grande desvantagem dos diluentes comerciais é que sua exata composição não é divulgada.

Os diluentes à base de água de coco *in natura* têm surgido como uma alternativa de baixo custo, prática e eficiente, apresentado excelentes resultados após a descongelação do sêmen canino (Silva *et al.*, 2000, Cardoso *et al.*, 2003). Porém, esses diluentes apresentam desvantagens, como a baixa disponibilidade dos frutos com características ideais para a sua fabricação e a impossibilidade de conservação por longo período da água de coco *in natura*. Ademais, a constituição bioquímica de um fruto pode apresentar pequenas variações em relação aos demais, o que pode diretamente influenciar a ação conservativa do diluente. Diante dessa problemática, novas pesquisas (Cardoso *et al.*, 2005) foram conduzidas no intuito de desenvolver a água de coco sob a forma de pó (ACP[®]), a qual apresenta os mesmos constituintes bioquímicos da forma *in natura*, porém é padronizada e mais eficazmente conservada, o que facilita sua comercialização para regiões onde o fruto não existe. O diluente

ACP® é similar ao Tris na criopreservação do sêmen de cães, não apresentando diferenças quanto à manutenção da qualidade seminal após a descongelação (Silva *et al.*, 2006a). Em 2007, Cardoso *et al.* demonstraram que esse diluente é eficiente na manutenção da capacidade de fertilização *in vitro*, obtendo-se uma taxa de 75,3% de interações entre espermatozóides caninos descongelados e oócitos homólogos.

Gema de ovo

A gema de ovo de galinha tem sido adicionada aos diluentes de sêmen por proteger a membrana plasmática, restaurando os fosfolípidios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento inicial do sêmen (Hammerstedt *et al.*, 1990). Moura *et al.* (2002) sugere que a gema de ovo de codorna, que é bastante rica em ácido ascórbico e outras vitaminas, pode também ser utilizada na congelação do sêmen canino.

Acredita-se que a proteção conferida pela gema possa ser devido à presença de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina, as quais interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propiciam a proteção durante o choque térmico (Bouchard *et al.*, 1990). Segundo Foulkes (1977), a gema de ovo previne também a liberação da enzima hialuronidase pelo espermatozóide.

Visto que a mesma também tem uma capacidade de tampão, a quantidade de gema de ovo no meio varia de acordo com a capacidade tamponante dos outros componentes do diluente (Farstad, 1996). Nesse contexto, a maioria dos autores utiliza concentrações de gema em torno de 20% no diluente (Farstad e Andersen-Berg, 1989; Martins, 2005; Silva, 2005).

Apesar de seus efeitos benéficos, a gema apresenta alguns inconvenientes, como a possibilidade de transmissão de doenças (Silva *et al.*, 2002b). Além disso, ela facilita o processo de oxidação sobre os espermatozóides caninos, podendo promover a peroxidação dos lipídios insaturados, à qual o espermatozóide canino é bastante sensível (Rodrigues, 1997). Por essas razões, pesquisas visando sua substituição por outros lipídios sintéticos e purificados observaram que os análogos do hidroxitolueno butilado (BHT) são interessantes substitutos para a gema, por também protegerem a membrana plasmática da injúria do choque térmico (Farstad, 1996). Foram também conduzidas pesquisas na ausência da gema de ovo, na qual se utilizando um diluente composto pelo tampão Tris acrescido apenas de glicerol, foi verificada uma motilidade espermática pós-descongelação de 35% (Silva *et al.*, 2002b).

A fração de baixa densidade da gema de ovo, principalmente composta por lipoproteínas de baixa densidade (LDL), parece ser a principal responsável pela proteção que a gema de ovo confere às células espermáticas (Foulkes, 1977). As LDL aderem às membranas celulares durante os procedimentos de congelação e descongelação e conferem proteção a essas membranas. Entretanto, a maneira como isso ocorre permanece por ser elucidada. Estudos recentes mostraram ser possível a purificação das LDL, permitindo sua utilização em substituição à gema de ovo integral (Moussa *et al.*, 2002). Entretanto, a literatura ainda é escassa de informações quanto ao uso das LDL na criopreservação do sêmen de cães.

Além de proteger a membrana espermática, a gema de ovo atua como uma fonte protéica para o diluente (Santos, 2004). Outras substâncias têm sido também utilizadas com este mesmo propósito na composição de diluentes para o sêmen do cão, como o leite desnatado (Rota *et al.*, 2001) e a albumina sérica bovina – BSA (Rodrigues, 1997; Sirivaidiapong *et al.*, 2000; Santos, 2004).

A incorporação de detergentes derivados do dodecil sulfato de sódio (SDS) aos diluentes, como o Equex STM (Peña, 2000) e o Orvus ES (Tsutsui *et al.*, 2000) vem sendo realizada. Segundo Peña (2000), o SDS é um detergente aniônico do grupo alquil, cujo efeito protetor sobre a célula espermática não está ainda totalmente compreendido. Porém, acredita-se que ele solubilize as lipoproteínas da gema de ovo e aumente deste modo seu potencial de proteção à célula espermática. Esse mesmo autor alertou ainda para o fato de que uma exposição prolongada dos espermatozóides ao SDS poderia conferir um excesso de fluidez à sua membrana plasmática.

Crioprotetores

A adição de crioprotetores melhora a sobrevivência celular após os processos de congelação e descongelação. Os agentes crioprotetores pertencem a dois grupos: 1) aqueles que penetram nas células, como o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etileno-glicol e o metanol; 2) aqueles que permanecem no meio extracelular, como as proteínas, os açúcares e o polivinil-pirrolidona (England, 1993).

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$), um álcool polihídrico altamente permeável com peso molecular 92,10, é o crioprotetor mais empregado na congelação de sêmen nas diferentes espécies (Silva *et al.*, 2003). Este crioprotetor penetra a membrana celular através da difusão passiva, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma (Parks e Graham, 1992). Sua difusão é de 30 a 60 vezes mais lenta que a da água (Graham, 1996). Nas espermátides de ratos foi identificada a presença de um canal protéico específico para a penetração do glicerol, denominado Aquaporina 7 (Ishibashi *et al.*, 1997), o qual se acredita existir também em células

espermáticas das demais espécies, haja vista a grande similaridade entre as mesmas.

Este crioprotetor, inicialmente, ocasiona um estresse osmótico ao espermatozóide, impedindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (Watson, 2000). Seus efeitos protetores são representados por propriedades coligativas, diminuição do ponto de congelamento e conseqüente redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra (Lovelock e Polge, 1954).

Curry (2000) e Holt (2000) reportaram que o glicerol exerce efeitos tóxicos sobre os espermatozoides, como alterações físico-químicas que podem levar à ruptura da membrana plasmática, à remoção de importantes proteínas membranárias, ou originar danos acrossomais. O glicerol pode induzir modificações na estabilidade da estrutura lipídica e na permeabilidade da membrana celular. A fusogenicidade da membrana e sua resposta ao sinal de transdução podem ser também afetadas, contribuindo para a redução da longevidade e aceleração da capacitação espermática (Watson, 1995).

A concentração ideal de glicerol no diluente seria aquela em que há uma predominância de seus efeitos protetores sobre os efeitos tóxicos. Essa concentração pode ser influenciada por outros componentes do diluente, pelo padrão de resfriamento, pelos métodos de congelação e descongelação, e pelas características seminais de cada espécie (Watson, 1979). No uso do diluente Tris, concentrações entre 4 e 6% de glicerol têm sido as mais indicadas (Ravaszova *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2002a). Utilizando o diluente à base de água de coco *in natura*, Cardoso *et al.* (2003) demonstraram que poderiam ser utilizadas indistintamente as concentrações de 4, 6 e 8% de glicerol na congelação do sêmen de cães.

Os agentes crioprotetores penetrantes, particularmente o glicerol, protegem a célula da crioinjúria durante a fase de cristalização que ocorre entre -6° e -10°C. Dessa forma, não pareceria ser lógico adicionar o glicerol a temperaturas superiores a 30°C (Colas, 1975). Porém, já foi demonstrado que o glicerol poderia ser adicionado ao sêmen canino a 37 °C (Peña *et al.*, 1998), a 27° C ou a 4°C (Silva *et al.*, 2006b). Tal adição poderia ser realizada quer seja na forma única ou fracionada (Silva *et al.*, 2003), sendo a adição única mais indicada por conferir mais praticidade ao processo.

Tal qual em outras espécies, a ausência de glicerol durante a criopreservação do sêmen canino resulta em uma redução na sobrevivência espermática após a descongelação, apresentando valores que variam de 11% (Olar *et al.*, 1989) a 20% (Silva *et al.*, 2002b) de motilidade espermática após a descongelação.

Alternativamente ao glicerol, outros crioprotetores foram também testados para a criopreservação do sêmen de cães. Olar *et al.* (1989) demonstraram que a incorporação do dimetil-sulfóxido isoladamente ou em associação com o glicerol, aos diluentes à base de Tris ou lactose, não melhora as taxas de motilidade e sobrevivência espermática após a descongelação, quando comparado ao glicerol. Kim *et al.* (1994) investigaram o uso do metanol como crioprotetor para o sêmen de cães e obtiveram uma taxa de concepção de 42,8% após inseminação artificial utilizando esse meio.

O etileno-glicol é um crioprotetor de baixo peso molecular (62,07), que poderia apresentar uma baixa toxicidade e uma maior capacidade de penetração nas células espermáticas. Ao ser incorporado ao diluente Tris em diferentes concentrações para a criopreservação do sêmen de cães tem apresentado resultados bastante contraditórios. Alguns autores mostraram que os resultados *in vitro* são similares (Soares *et al.*, 2002) ou até mesmo superiores ao glicerol (Rota *et al.*, 2006). Por outro lado, Martins-Bessa *et al.* (2006) demonstraram não existirem vantagens na adição do etileno-glicol isoladamente ou associado ao glicerol ao diluente Tris para a congelação do sêmen canino, quando comparado ao glicerol isolado.

As amidas, como a formamida, dimetil-formamida e lactamida, são agentes crioprotetores permeantes, de baixo peso molecular, que vêm também sendo testadas na composição de diluentes para o sêmen de diferentes espécies (Alvarenga *et al.*, 2005). Em cães, foi demonstrado que a dimetil-formamida poderia ser utilizada na criopreservação de sêmen associada aos diluentes lactose-gema (Oliveira, 2003) ou Tris-gema (Quintela, 2005), apresentando resultados satisfatórios após a descongelação.

Antibióticos

Os ejaculados são estéreis, mas sua contaminação a partir do prepúcio, uretra e pênis é inevitável durante o processo de coleta. Essa contaminação pode ser menor com o uso de técnicas assépticas e medidas de higiene antes e durante a coleta. A contaminação bacteriana pode afetar negativamente a fertilidade, pela própria presença de bactérias, pela produção de toxinas, por degradação dos componentes do meio, ou ainda, pela utilização de substratos metabólicos. Essa situação determina a necessidade de incorporar aos diluentes substâncias de efeito antimicrobiano (Watson, 1990).

A associação clássica de Penicilina e Estreptomicina resulta numa preparação antibiótica eficaz e possivelmente a mais utilizada na elaboração de diluentes seminais (Álamo *et al.*, 2005, Martins-Bessa *et al.*, 2006). A Amicacina é um outro antibiótico que vem sendo utilizado com sucesso no preparo de diluentes para o sêmen canino (Martins, 2005; Chirinéia *et al.*, 2006). Porém, diversos trabalhos vêm sendo conduzidos na ausência de antibióticos no meio de congelação e têm obtido sucesso (Silva *et al.*, 2006a, b, c, Cardoso *et al.*, 2007). Isso mostra a necessidade de maiores estudos acerca da adição de substâncias antibióticas ao diluente para

a criopreservação de sêmen canino.

Diluição

Vários trabalhos em tecnologia de sêmen canino empregam diluições baseadas em uma concentração espermática pré-fixada na ordem de 100 (Tsutsui *et al.*, 2000), 200 (Sirivaidyapong *et al.*, 2001), 400 e 800 x 10⁶ de espermatozoides/mL (Peña e Linde-Forsberg, 2000). Essa diluição possibilita calcular o número de espermatozoides por palheta e determinar a exata proporção entre o diluente e as células espermáticas. Por outro lado, outras pesquisas têm utilizado diluições baseadas na proporção de um volume fixo, entre uma parte de sêmen e: uma parte de diluente (Cardoso *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003), duas partes de diluente (Silva e Verstegen, 1995), três partes de diluente (Yildiz *et al.*, 2000), e até quatro partes de diluente (England e Ponzio, 1996). Segundo esse método de diluição, não existe necessidade de se contar os espermatozoides, rendendo mais praticidade ao procedimento e reduzindo o tempo e os custos envolvidos com a congelação do sêmen.

Uma diluição excessiva poderia levar a uma perda permanente da motilidade, da atividade metabólica e da capacidade fertilizante da célula espermática (Mann, 1964). As proteínas do plasma seminal são importantes para a manutenção da viabilidade seminal de ovinos, prevenindo os danos oriundos do choque térmico sobre a membrana espermática (Pérez-Pé *et al.*, 2001). A partir desse conhecimento, é possível que uma diluição excessiva minimize os efeitos benéficos de substâncias presentes dos fluidos testiculares e epididimários que compõem a fração espermática em cães. De fato, sabe-se que altas taxas de diluição, tais como de uma parte de sêmen para 16 ou 32 partes de diluente, causam um decréscimo significativo na motilidade progressiva no sêmen de cães (Wales e White, 1963; England, 1993).

Em 2005, Silva *et al.* mostraram que não existem diferenças entre as duas formas de diluição, e o sêmen canino poderia ser eficientemente diluído em Tris a uma concentração fixa de 200 x 10⁶ espermatozoides/mL, ou a uma diluição baseada em um volume fixo, na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de diluente. Experimento semelhante foi conduzido por Cardoso *et al.* (2006) utilizando um diluente à base de água de coco *in natura* e, novamente, não foram encontradas diferenças entre os dois métodos de diluição para o sêmen canino.

Envase

O sêmen canino pode ser envasado de diferentes formas. Ivanova-Kicheva *et al.* (1997) demonstraram que espermatozoides caninos criopreservados em tubos de alumínio de 5 mL com os diluentes Tris-frutose, Tris-glicose e lactose apresentam melhor qualidade do que aqueles criopreservados em pastilhas. Nizanski *et al.* (2003) compararam diferentes formas de armazenagem e verificaram que a qualidade do sêmen canino criopreservado é melhor conservada em pastilhas e palhetas de 0,5 mL do que em minitubos de 0,25mL.

As curvas de congelação podem ser essencialmente diferentes para o envase em pastilhas e palhetas, e o uso do mesmo padrão de descongelação quando comparando os dois métodos de envase poderia complicar a interpretação dos resultados. A congelação em palhetas tem a vantagem sobre as pastilhas em facilitar a identificação do doador de sêmen e reduzir a possibilidade de contaminação, que se torna importante com o movimento de sêmen congelado entre os países (Farstad, 1996).

Criopreservação

Diversas metodologias têm sido descritas para a congelação do sêmen de cães e variam de acordo com o diluente, protetores de resfriamento e agentes crioprotetores empregados, preconizando o uso de diferentes velocidades de congelação. Em todas, busca-se minimizar o dano causado ao espermatozoide pelo processamento, visando recuperar um máximo possível de espermatozoides viáveis (Strom *et al.*, 1997).

O método de criopreservação de sêmen canino mais usual é aquele descrito por Andersen (1975). Neste método, foi realizada a diluição do sêmen a 37°C em Tris acrescido de gema de ovo e glicerol. Em seguida, foi procedido um período de equilíbrio de três horas, seguido do envase em palhetas plásticas e a exposição aos vapores de nitrogênio para congelação. Atualmente, esse método tem servido como base para inúmeros trabalhos onde têm sido realizadas pequenas modificações, alcançando excelentes resultados *in vitro* (Rota *et al.*, 2006) e *in vivo* (Thomassen *et al.*, 2006). Martins (2005) e Chirinéia *et al.* (2006) realizaram a diluição a 37°C, imediatamente seguida do envase em palhetas de 0,5 mL. Em seguida, esses autores transferiram as amostras para um refrigerador programado a 5°C por uma hora e, finalmente, expuseram as palhetas ao vapor de nitrogênio por 20 min, sendo o sêmen armazenado em botijão criogênico.

O método CLONE foi desenvolvido para aplicação comercial pelo Cryogenic Laboratories of New England, Inc. (CLONE) e tem sido utilizado desde 1983. Ele consiste na diluição do sêmen à temperatura ambiente em um diluente denominado Clone A. Procede-se então o período de equilíbrio de uma hora, a adição do diluente Clone B, o envase e a exposição aos vapores de nitrogênio. Esse método tem também proporcionado

excelentes resultados após a descongelação (Strom *et al.*, 1997).

Em 2000, Silva *et al.* adaptaram a metodologia de congelação do sêmen de caprinos com o diluente à base de água de coco (Nunes *et al.*, 1997) para a congelação do sêmen de cães com o diluente Tris. Estes autores observaram que este método é de grande praticidade e é mais rápido que o método de Andersen, por não requerer um tempo de equilíbrio após a adição de glicerol. Em 2006a, Silva *et al.* mostraram que o sêmen canino diluído em Tris e congelado através desse método é capaz de manter sua capacidade de fertilização *in vitro*, tendo sido observada uma taxa de 72,7% de interações entre espermatozóides descongelados e oócitos homólogos.

Atualmente, um fator de destaque no estudo dos métodos de congelação de sêmen tem sido o uso de diferentes equipamentos para o abaixamento da temperatura, como: tanques de congelação (Peña e Linde-Forsberg, 2000), ultra-freezers (Álamo *et al.*, 2005; Batista *et al.*, 2006) e máquinas computadorizadas de congelação (Rota *et al.*, 2005; Schaefer-Somi *et al.*, 2006). Esses equipamentos têm mostrado melhores resultados que os métodos convencionais que utilizam a exposição direta aos vapores de nitrogênio, pois impedem a ocorrência de oscilações térmicas durante a congelação, possibilitando uma melhora nos resultados após a descongelação.

Descongelação

De maneira análoga ao processo de congelação espermática, existem vários protocolos preconizando diferentes temperaturas e velocidades de descongelação para o sêmen canino. Badinand *et al.* (1990) sugerem que a descongelação do sêmen a 37 °C por 45s é um método seguro, pois o tempo de permanência em temperaturas altas poderia ser crítico e de influência letal sobre a viabilidade espermática. Do mesmo modo, Silva *et al.* (1998) sugerem que a temperatura de 37°C por 60s promove uma menor porcentagem de alterações morfológicas espermáticas do que a de 50°C por 30s.

Por outro lado, Ivanova-Kicheva *et al.* (1995), comparando os processos de descongelação a 37 °C por 8s e 55 °C por 5s, observaram que a motilidade espermática foi melhor preservada a 55 °C e sugeriram que a elevação da temperatura de descongelação reduz o dano osmótico nas células, além de prevenir a formação de cristais. Além disso, Martins (2005) e Chirinéa *et al.* (2006) utilizaram um método de descongelação a 72°C por 8s para o sêmen de cães e obtiveram excelente qualidade espermática pós-descongelação. Usualmente, este processo é realizado sob imersão em banho-maria a temperaturas que variam de 37 °C (Linde-Forsberg, 1991) a 75 °C (Olar *et al.*, 1989).

Considerações finais

Um protocolo de preservação adequado deve manter o potencial fertilizante das células espermáticas que deverão, ao final de todo o processo, apresentar a vitalidade necessária para atingir o local da fertilização e estarem aptas a concluir a capacitação e a reação acrossômica, que constituem o estágio final de maturação espermática e possibilitam a fecundação do oócito (Watson, 1995).

Diversos trabalhos afirmam existir diferenças relativas à congelabilidade seminal entre os cães (Rota *et al.*, 2005; Batista *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006b). Já foi identificado que os espermatozóides de diferentes cães apresentam diferenças quanto à permeabilidade de sua membrana plasmática, que pode se refletir em diferentes resultados após a descongelação (Yu *et al.*, 2002), mas não se sabe ainda qual fator determina essa diferença de permeabilidade na membrana celular, tal qual já estudado em suínos (De Leeuw *et al.*, 1990) e camundongos (Phelps *et al.*, 1999). Isso seria então um indicativo que novas pesquisas devam ser conduzidas no intuito de identificar o fator que confere uma maior congelabilidade ao sêmen de determinados cães, possibilitando o aprimoramento dos protocolos de congelação seminal nesta espécie.

Recentemente, foi demonstrada a possibilidade de manutenção do sêmen canino sob refrigeração, até que seja iniciado o procedimento de criopreservação (Chirinéa *et al.*, 2006; Hermansson e Linde-Forsberg, 2006). Devido ao fato de que existem ainda relativamente poucos centros aptos à congelação do sêmen de cães em alguns países, como o Brasil, a possibilidade de transporte do sêmen canino sob refrigeração até os laboratórios aparece como uma importante perspectiva para a difusão da tecnologia de sêmen nessa espécie.

Diferentes metodologias têm sido preconizadas para a criopreservação do sêmen canino. Porém, mesmo ao serem utilizados os métodos mais adequados para esse propósito, uma perda considerável em torno de 30 a 40% dos espermatozóides após a descongelação tem sido observada (Chirinéa *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006c; Cardoso *et al.*, 2007). Nesse sentido, o campo da criobiologia espermática permanece ainda em aberto, visando o aperfeiçoamento de metodologias de criopreservação de sêmen não apenas em cães, mas nas diferentes espécies, no intuito de se proporcionar uma perda mínima de espermatozóides após a descongelação.

Referências

- Álamo D, Batista M, Gonzalez F, Rodriguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 degrees C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, v.63, p.72-82, 2005.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros AS. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.105-113, 2005.
- Andersen K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchtygiene*, v.10, p.1-4, 1975.
- Badinand F, Fontbonne A, Adoue C. Préparation, conditionnement, conservation et utilisation de la semence du chien en insémination artificielle. *Elev Ins*, v.239, p.3-15, 1990.
- Batista M, Alamo D, Gonzalez F, Cruz MG, Gracia A. Influence of the freezing technique (nitrogen liquid vs ultrafreezer of -152 degrees C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. *Reprod Dom Anim*, v.41, p.423-428, 2006.
- Bouchard GF, Morris JK, Sikes JD, Youngquist RS. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology*, v.34, p.147-157, 1990.
- Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. *Anim Reprod Sci*, v.92, p.384-391, 2006.
- Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Anim Reprod*, v.2, p.257-262, 2005.
- Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM, Chirinéa VH, Souza FF, Lopes MD. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106® using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. *Reprod Dom Anim*, v.42, p.11-16, 2007.
- Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. 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 VH, Martins MIM, Souza FF, Tebet JM, Papa FO, Lopes MD. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. *Ci Anim Bras*, v.7, p.407-415, 2006.
- Colas G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. *J Reprod Fertil*, v.42, p.277-285, 1975.
- Concannon PW, Battista M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk RW. (Ed.). *Current veterinary therapy*. Philadelphia: WB Saunders, 1989. p.1247-1259.
- Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod*, v.5, p.46-52, 2000.
- Davis IS, Bratton RW, Foote RH. Livability of bovine spermatozoa at 50, -25 e -85°C in Tris-buffered and citrate-buffered yolk glycerol extenders. *J Dairy Sci*, v.46, p.333-336, 1963.
- De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij A. Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, v.27, p.171-183, 1990.
- England GCW. Cryopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fertil*, v.47, p.243 -255, 1993.
- England GCW, Ponzio P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, v.46, p.165-171, 1996.
- Farstad W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.251-260, 1996.
- Farstad W, Andersen-Berg K. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J Reprod Fétil*, v.39, p.289-292, 1989.
- Foote RH. Extenders for freezing dog semen. *Am J Vet Res*, v.25, p.37-40. 1964.
- Foulkes JA. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.49, p.277-284, 1977.
- Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am*, v.12, p.131-147, 1996.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, v.11, p.73-88, 1990.
- Harrop AE. Artificial insemination in the dog. In: Maule PT (Ed.). *The semen of animals and artificial insemination*. Weybridge: Commonwealth Agricultural Bureau, 1962. p.304-315.
- Hermansson U, Linde-Forsberg C. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.65, p.584-593, 2006.
- Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v. 53, p. 47-58, 2000.
- Ishibashi K, Kuwanhara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Susuki F, Marumo F, Sasaki S. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *J Biol Chem*, v. 272, p.782-786, 1997.
- Ivanova-Kicheva MG, Bobadov ND, Somlev B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology*, v.48, p.1343-1349, 1997.

- 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.
- Kim YJ, Park YJ, Kim BJ, Yu IJ.** Artificial insemination with frozen semen in the dog – simple freezing method using methanol. *Korean J Vet Res*, v.34, p.851-855, 1994.
- Linde-Forsberg C.** Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am*, v.21, p.467-485, 1991.
- Lovelock JE, Polge C.** The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Byochem J*, v.58, p.318-322, 1954.
- Mann, T.** *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. London: Methuen, 1964.
- Martin ICA.** The deep freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim milk. *Res Vet Sci*, v.4, p.315-325, 1963.
- Martins MIM.** *Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães*. 2005. 123f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.
- Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A.** Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in Tris-egg yolk extenders. *Theriogenology*, .66, p.2047-2055, 2006.
- Mcphail DB, Goodman BA.** Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems. *Bioch J*, v.221, p.559-560, 1984.
- Moura CS, Cavalcanti MCO, Guerra MMP, Batista AM, Barreto MBP.** Teste de avaliação in vitro e criopreservação do sêmen do cão utilizando diferentes diluidores. *Rev Bras Ci Vet*, v.9, p.102-106, 2002.
- Moussa M, Martine, V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M.** Low density lipoproteins extract from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.
- Nizanski W, Dubiel A.** The effect of packaging systems on post-thaw spermatozoal characteristics in cryopreserved dog semen. *Med Wet*, v.59, p.829-833, 2003.
- Nothling JO, Gerstenberg C, Volkman DH.** Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – a retrospective study. *J South Afr Vet Assoc*, v.66, p.49-55, 1995.
- Nunes JF, Ciríaco ALT, Suassuna U.** *Produção e reprodução de caprinos e ovinos*. Brasil: Gráfica LCR, 1997.
- Olar TT, Bowen RA, Pickett BW.** Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, v.31, p.451-461, 1989.
- Oliveira ECS.** *Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino*. 2003. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2003.
- Parks EJ, Graham JK.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- 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.
- Peña AI.** *Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity*. 2000, 86f. Thesis (Doctoral, Veterinary Medicine) - Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, 2000.
- Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradón PG.** Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, v.50, p.163-174, 1998.
- Pérez-Pé R, Cébrían-Pérez JÁ, Muíño-Blanco T.** Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.56, p.425-434, 2001.
- Phelps MJ, Liu J, Benson JD, Willoughby CE, Gilmore JA, Critser JK.** Effect of Percoll separation, cryoprotective agents and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance for cryopreservation. *Biol Reprod*, v.61, p.10312-1041, 1999.
- Quintela AT.** *Efeito do crioprotetor sobre parâmetros espermáticos do sêmen canino nas diferentes etapas da criopreservação*. 2005. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Veterinária, Salvador, 2005.
- Ravaszova O, Mesáros P, Cingakova V, Lukacinova M.** A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage. *Folia Vet*, v.40, p.95-99, 1996.
- Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE.** Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, v.56, p.815-829, 2001.
- Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernandez-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE.** Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*, v.123, p.579-591, 2002.
- Rodrigues BA.** *Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado*. 1997. 176f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 1997.

- Rota A, Frishling A, Vannozi I, Camillo F, Romagnoli S.** Effect of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil*, v.57, p.377-381, 2001.
- Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M.** Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, v.65, p.1848-1858, 2006.
- Rota A, Rota A, Martine M, Milani C, Romagnoli S.** Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod Nutr Dev*, v.45, p.29-37, 2005.
- Santos IW.** *Albumina sérica bovina como fonte protéica do diluidor Tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino.* 2004. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2004.
- Schafer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C.** Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, v. 66, p.173-182, 2006.
- Seae SWJ.** Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *A I Dig*, p.17-26, 1969.
- Silva AR.** *Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos.* 2005. 165f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2005.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Efeito do processo de descongelamento sobre a viabilidade do sêmen canino in vitro. *Ci Anim*, v.8, p.75-80, 1998.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Comparação entre a água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.43, p.767-774, 2006a.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Comparison between different dilution rates on canine semen freezing using Tris-buffer with the addition of egg-yolk and glycerol. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.57, p.764-771, 2005.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. *Ci Rur*, v.6, p.1021-1025, 2000.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reprod Dom Anim*, v.41, p.74-78, 2006b.
- Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM.** Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, v.59, p.821-829, 2003.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM, Chirinea VH, Lopes MD, Souza FF.** Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm oocyte interactions. *Theriogenology*, v.66, p.456-462, 2006c.
- Silva AR, Cardoso RC, Uchoa DC, Silva LDM.** Canine semen cryopreservation with different glycerol concentrations. *Rev Bras Ci Vet*, v.9, p.25-28, 2002a.
- Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM.** Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The Vet J*, v.164, p.244-246, 2002b.
- Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM.** Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, v.59, p.821-829, 2003.
- Silva LDM, Verstegen J.** Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v.44, p.571-579, 1995.
- Sirivaidyapong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bever, MM, Colenbrander B.** Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology*, v.53, p.789-802, 2000.
- Sirivaidyapong S, Ursen P, Bevers MM, Colenbrander B.** Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.57, p.383-386, 2001.
- Soares MP, Rossi CAR, Mezzalira A, Cecim M.** Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. *Ci Rur*, v.32, p.649-655, 2002.
- Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C.** In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.247-256, 1997.
- Thomassen R, Sanson G, Krogenaes A, Fougner JA, Berg KA, Farstad W.** Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology*, v.66, p.1645-1650, 2006.
- Tsutsui T, Hase M, Hori T, Komoriya K, Shimizu N, Nagakubo K, Kawakami E.** Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *J Vet Med Sci*, v.62, p.537-538, 2000.
- Wales RG, White IG.** Viability of diluted dog spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil*, v.5, p.67-76, 1963.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.481-492, 2000.
- Watson PF.** The preservation of semen in mammals. *Oxford Rev Reprod Biol*, v.1, p.183-350, 1979.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T.** Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, v.54, p.579-585, 2000.
- Yu I, Songsanssen N, Godke RA, Leibo SP.** Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, v.44, p.62-78, 2002.