

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

UNESP

Campus de Botucatu

CONGELAÇÃO DE SÊMEN CANINO

VIVIANE HELENA CHIRINÉA

Monografia apresentada à disciplina
"Seminários I", programa de pós-
graduação na área de Reprodução
Animal, curso Mestrado.

Docentes responsáveis:

Prof. Dra. Maria Denise Lopes

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Botucatu-SP

2002

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	02
OBJETIVOS	03
REVISÃO DE LITERATURA	03
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

INTRODUÇÃO

O primeiro êxito na congelação de sêmen canino foi descrito por ROWSON (1954), enquanto SEAGER (1969) relatou a primeira prenhez resultante de inseminação artificial (IA) com a utilização de sêmen canino congelado. Desde essa época, diversos são os estudos nos quais investiga-se métodos de preservação de espermatozoides caninos pela congelação. No entanto, os resultados obtidos após IA com sêmen canino congelado ainda são bastante heterogêneos (LINDE-FORSBERG e FORSBERG, 1989; ENGLAND, 1993).

As razões para a utilização do sêmen congelado em cães são inúmeras e incluem a possibilidade de transporte do sêmen para longas distâncias e o seu armazenamento por tempo indeterminado. Adicionalmente, a congelação permite a diminuição de gastos, que ocorrerem com a necessidade de exportação de um animal. Evita-se ainda, o envio da fêmea para o local onde está o macho, o que é um procedimento desgastante e pode refletir negativamente na eficiência reprodutiva da fêmea, além dos riscos sanitários (LINDE-FORSBERG e FORSBERG, 1989).

O uso limitado do sêmen congelado na espécie canina deve-se principalmente aos baixos índices de fertilidade apresentados (ENGLAND, 1993). A maioria dos pesquisadores tem congelado o sêmen de cães, utilizando metodologia descrita para outras espécies. Esses estudos têm demonstrado que o sêmen descongelado de cães é de baixa qualidade, com taxas de concepção inferiores a de outras espécies. De acordo com CONCANNON e BATTISTA (1989) e SILVA e VERSTEGEN (1995) a baixa fertilidade do sêmen congelado canino se deve principalmente a sua baixa viabilidade pós-descongelação para fertilização do óvulo, identificação do momento ideal da ovulação nas fêmeas e ao local de deposição do sêmen no trato genital feminino.

OBJETIVO

Na última década houve maior interesse na inseminação artificial e na criopreservação do sêmen na espécie canina. Assim, tornou-se fundamental ampliar os conhecimentos sobre as características do sêmen canino, manipulação adequada do sêmen após a coleta, uso de diluidores eficientes e processamentos que envolvem a criopreservação.

Portanto, o objetivo desta revisão é discutir sobre alguns aspectos da congelação do sêmen canino, com ênfase nos princípios gerais da criopreservação e componentes dos meios diluidores.

REVISÃO DE LITERATURA

1) PRINCÍPIOS GERAIS DA CRIOPRESERVAÇÃO:

Desde que a água no estado líquido é considerada essencial para estrutura e função de células vivas, não surpreende que a sua solidificação, durante o processo de congelação é geralmente letal para célula. Paradoxalmente a congelação também pode preservar células por longos períodos de tempo em um estado viável, e talvez algum dia o armazenamento por longos períodos de tempo de tecidos e órgãos. A congelação pode ser usada para preservar constituintes da ultra-estrutura celular, mas é também usada para o rompimento das células e organelas para o isolamento de constituintes. A congelação pode cessar algumas reações bioquímicas e acelerar outras (MAZUR, 1984).

O processo de criopreservação representa uma interrupção artificial do progresso de maturação do espermatozóide pós-ejaculação e na fertilização. O maior problema com relação a criopreservação de sêmen é que mesmo utilizando as melhores

técnicas, o padrão de sobrevivência pós-descongelação é restrito em cerca de 50% da população espermática (WATSON, 1995).

De acordo com Mazur (1984), as mudanças celulares que ocorrem durante a congelação não estão associadas a sua habilidade de se armazenarem em temperaturas muito baixas, mas sim a sua letalidade numa zona de temperatura intermediária (-15°C a -60°C), que a célula atravessa duas vezes, uma durante a congelação e uma outra durante a descongelação. Nenhuma reação térmica ocorre num sistema aquoso a temperatura de nitrogênio líquido (-196°C) uma explicação para isso é que não existe água líquida ao redor da temperatura de -130°C. O único estado físico que existe são os cristais e nesse estado a viscosidade é alta e a difusão insignificante; portanto a -196°C não há energia térmica para reação química (MCGEE et al., 1962).

As únicas reações que podem ocorrer num sistema aquoso congelado a -196°C são eventos fotofísicos como a formação de radicais livres e a produção de macromoléculas que se quebram como resultado direto do impacto pelas radiações ionizantes. Entretanto, a dose de radiação ionizante requerida para causar injúrias nas células, levariam de 2000 a 4000 anos para causar este efeito (WATSON, 2000).

Hammerstedt et al. (1990) descreveu 5 diferentes etapas no processo de criopreservação do espermatozóide: 1) diluição e refrigeração; 2) penetração do crioprotetor e envasamento; 3) congelação; 4) armazenamento; 5) descongelação. Métodos específicos devem ser desenvolvidos para cada uma das espécies, pois cada uma dessas etapas tem um impacto único sobre a sobrevivência da célula no processo de criopreservação.

A) DILUIÇÃO DO SÊMEN:

Independentemente da espécie, o uso dos meios diluidores tanto para resfriar como para congelar o sêmen são de extrema importância. O meio diluidor deve apresentar: 1) nutrientes que são usados como fontes de energia; 2) tampões que

impeçam as mudanças nocivas de pH; 3) pressão osmótica fisiológica e concentração de eletrólitos; 4) prevenção no crescimento de bactérias; 5) substância protetora contra choque térmico durante o resfriamento; 6) crioprotetores para reduzir os danos da congelação (CONCANNON e BATTISTA, 1989). A maioria dos protocolos de meios diluidores resultam de modificações feitas com sucesso apartir do diluidor de sêmen básico de bovinos. Esse protocolo contem gema de ovo, tampão, açúcar metabolizado e glicerol. Cada ingrediente incorporado ao meio diluidor tem sua função essencial e/ou protetora (BATEMAN, 2001).

GEMA DE OVO

A gema de ovo, especialmente os fosfolipídios que são frações lipoprotéicas de baixa densidade tem sido mostrado como protetor da membrana ao choque térmico. O mecanismo de proteção da gema de ovo está relacionado a sua ação na superfície da membrana plasmática induzindo possivelmente a alterações não permanente na composição dessa membrana; também previne o rompimento da membrana (WATSON, 1990; PARKS e GRAHAM, 1992; ENGLAND, 1993).

TAMPÃO

A atividade metabólica do espermatozóide resulta num armazenamento de íons de hidrogênio, portanto um "buffer" no extensor é necessário para remoção desses íons. Sem esse tampão o aumento dos íons hidrogênios produzidos pelo metabolismo espermático causam uma queda do pH do meio, com subsequente diminuição na longevidade e fertilidade espermática (SMITH, 1984).

B) RESFRIAMENTO:

As primeiras mudanças na temperatura durante o processo de criopreservação, isto é, durante a refrigeração, são conhecidas por alterar as propriedades físicas de todas as membranas celulares (HAMMERSTEDT et al., 1990). Embora, ainda não

totalmente esclarecido, há um rearranjo na relação lipídio-proteína resultando na perda da permeabilidade seletiva que é uma característica das membranas biológicas (HAMMERSTEDT et al., 1990; LEEUW et al., 1990; WATSON, 1995).

As proteínas integrais de membrana são posicionadas entre os lipídios, e uma modificação nos lipídios pode alterar a posição e a função dessas proteínas, como um canal protéico para íons (WATSON, 2000). Por exemplo, o fluxo de cálcio através da membrana submetida à refrigeração tem sérias conseqüências para a função celular. A regulação de cálcio é essencial no controle da capacitação (DRAGILEVA et al., 1999; PARRISH et al., 1999). Relatos de características semelhantes à capacitação (hiperativação) são observados nos espermatozoides congelados e descongelados de várias espécies (ROTA, 1998; BAILEY et al., 2000) e podem resultar da regulação de cálcio nas células submetidas ao abaixamento de temperatura. A prevenção dessa alteração entre os lipídios e proteínas por taxas de refrigeração mais lenta ou diluição das células espermáticas de meios extensores podem ser infrutíferas. Há ainda a possibilidade de elementos do citoesqueleto das células serem sensíveis a fusão desorganizada das membranas celulares, seguindo a criopreservação (WATSON, 2000).

C) ADIÇÃO DO CRIOPROTETOR:

A adição do glicerol aos meios extensores reduz substancialmente as injúrias da criopreservação; entretanto, essa adição e sua remoção também causam alterações nas células espermáticas (FAHY, 1986; PARKS e GRAHAM, 1992; GAO et al., 1993; WATSON, 1995; ROTA, 1998). O glicerol é osmoticamente ativo, e sua adição temporária causa mudanças no volume e perda de água na célula. O glicerol altera as propriedades coligativas da água, abaixando o ponto de congelação e providenciando um tempo maior para saída de água da célula antes da congelação e formação de cristais

de gelo, que podem modificar as organelas intracelulares (HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995). Os crioprotetores, incluindo o glicerol, causam inicialmente desidratação da célula por induzir a saída de água. Pensava-se, inicialmente, que o glicerol penetrava lentamente através das membranas permeáveis, por isso, um tempo de equilíbrio relativamente longo era necessário para que esse composto exercesse seus efeitos antes da amostra ser congelada. Entretanto, se postula a idéia que o glicerol penetra na célula rapidamente e o tempo de equilíbrio não é mais necessário (WATSON, 1995).

D) CONGELAÇÃO:

Desde que o crioprotetor é adicionado e equilibrado o sêmen diluído é envasado (*pellets*, palhetas) e a congelação se inicia. As taxas de congelação variam na dependência da espécie e do método de envase. A congelação se inicia e a temperatura diminui para -5 a -15°C , que é correspondente ao super resfriamento, definido quando tem início a formação de cristais de gelo na solução ao redor das células, enquanto os componentes celulares permanecem descongelados. Provavelmente, os poros da membrana plasmática são pequenos para difusão dos cristais de gelo, por esse motivo, o crescimento de cristais de gelo dentro dessa fase são bloqueados (HAMMERSTEDT et al., 1990). A água super resfriada dentro da célula, devido a uma diferença no potencial químico, com água extracelular, favorece a saída de água de dentro da célula que se congela externamente (MAZUR, 1984). Como as temperaturas continuam a diminuir e a água extracelular já se encontra congelada, a célula é então exposta à condição hipertônica e a alta concentração de sal extracelular, causando ainda mais o efluxo (saída) de água. Movimentos de água para fora da célula diminuem a possibilidade de formação de cristais de gelo dentro da célula. Portanto, a taxa de

congelamento torna-se importante no controle da formação de cristais de gelo intracelular.

E) DESCONGELAÇÃO:

Durante a descongelamento os processos anteriormente mencionados ocorrem de forma inversa, o ingresso de água para o interior da célula.

Na descongelamento os cristais de gelo intracelulares (na maioria das vezes pequenos) apresentam uma tendência a se agregarem para formação de cristais de gelo maiores (recristalização). As células devem então ser descongeladas de uma maneira rápida capaz de prevenir a recristalização e as conseqüentes alterações de membrana, mas não tão rápido que o influxo de água cause alteração nas acomodações das membranas celulares. A remoção dos crioprotetores imediatamente após a descongelamento é devido à toxicidade do crioprotetor sobre as células espermáticas, na temperatura de descongelamento. A remoção do crioprotetor também retorna a solução a condições isotônicas requeridas para função espermática (FAHY, 1986).

2) COMPONENTES DOS MEIOS DILUIDORES DE SÊMEN CANINO:

A) CARACTERÍSTICAS GERAIS:

Para congelamento do sêmen canino, o sêmen é coletado por ejaculação manual e avaliado para suas características macro e microscópicas. A porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo declina significativamente com a congelamento e descongelamento, e, portanto, somente amostras de qualidade excelente para boa, com um número total de espermatozoides adequado para cada cão, baseado no peso corporal e circunferência escrotal, e motilidade espermática progressiva maior que 70%, deveriam ser considerado para criopreservação. O sêmen pode ser coletado

muitas vezes com intervalos regulares, para permitir a congelação e o armazenamento de um número razoável de doses inseminantes (JOHNSTON et al., 2001).

Após a coleta o sêmen canino deve ser centrifugado e a fração rica em espermatozoides diluída. As células espermáticas diluídas devem então ser refrigerada antes de congelada (tempo de equilíbrio) para reduzir as alterações devido ao choque térmico (WATSON, 1979; CONCANNON e BATTISTA, 1989). O espermatozóide de cães férteis responde de forma diferente aos métodos de congelação.

Muitos métodos para congelação de sêmen canino têm sido descritos na literatura, incluindo, a congelação em gotas diretamente no nitrogênio líquido, e utilizando o metanol como meio de congelação (YU et al., 1997; KIN et al., 1994, 1995).

Os diluentes básicos utilizados para congelação do sêmen, incluem os seguintes componentes: 1) água bidestilada ou ultrapura, usada como solvente; 2) substâncias iônicas e não-iônicas para manutenção da osmolaridade e pH do meio; 3) materiais orgânicos para prevenir ou atenuar o choque térmico (gema de ovo ou leite); 4) agentes crioprotetores, como glicerol ou DMSO; 5) açúcares simples, como fonte de energia e di ou trissacarídeos, como crioprotetores adicionais; 6) aditivos como enzimas, detergentes e aminoácidos que podem melhorar a fertilidade; 7) antibióticos para controlar o crescimento microbiano (SALISBURY et al., 1978).

B) MEIOS EXTENSORES:

O uso de uma ampla variedade de meios diluidores para congelação de sêmen canino tem sido citado. A composição correta do meio diluidor é vital para criopreservação do sêmen e deve ser determinada para cada espécie. Foote (1964) e Foote e Leonard (1964), foram os primeiros pesquisadores a investigar sistematicamente a combinação e a quantidade de vários componentes dos diluidores para a preservação do sêmen de cão. Após examinar efeitos dos diferentes tampões

(citrato x fosfato x glicina) a porcentagem de gema de ovo, e o pH do sêmen do cão, armazenado a 5°C, concluíram que a melhor combinação para preservar a motilidade foi 20% de gema de ovo (v/v), 1,16% de citrato de sódio, 0,75% de glicina, 1% de glicose e pH=6,6. Subseqüentemente, o uso do Tris (Tris-hidroxymethyl-aminometano) repetidamente mostrou os melhores resultados de motilidade (BATTISTA et al., 1989; OLAR et al., 1989; THOMAS et al., 1993). Os benefícios do tampão usado em um extensor à base de gema de ovo, podem estar na dependência do método de envasamento. O Tris resultou em aumento da motilidade e longevidade quando as amostras foram congeladas em palhetas (BATTISTA et al., 1989; OLAR et al., 1989).

O creme de leite tem sido investigado no cão com uma motilidade e viabilidade espermática pós-descongelação comparável ao Tris (ROTA et al., 2000).

Lopes e Papa (1998) compararam efeitos da centrifugação nos diluidores glicina e Tris sobre a motilidade e vigor do sêmen canino. Estes autores verificaram que houve uma interação positiva entre a centrifugação e a congelação, e concluíram que o grupo centrifugado e congelado em meio glicina apresentou melhores resultados.

Santos et al. (1999) avaliaram o efeito de cinco diferentes diluidores na congelação do sêmen canino, sendo eles, Tris-frutose-ác. cítrico, glicina, lactose, leite desnatado e Tris-frutose-citrato, com a adição de glicerol em todos os casos realizada a 5°C. Estes autores concluíram que os diluidores Tris-frutose-ác. cítrico e glicina proporcionaram melhora na motilidade e no vigor espermático.

Mann (1964), observou que diluentes hipertônicos eram menos prejudiciais aos espermatozoides que os hipotônicos; por isso a maioria dos diluentes recomendados para congelação do sêmen canino são hipertônicos em relação ao plasma seminal. O ponto crioscópico do sêmen canino é de aproximadamente -0,55°C, equivalente a uma concentração de 300mOsm. Os diluentes hipertônicos atuam reduzindo a água

intracelular antes da congelação, diminuindo a formação de gelo intracelular (WATSON, 1979).

C) GEMA DE OVO:

Uma grande variedade na concentração de gema de ovo é descrita na preservação do sêmen canino. Foote e Leonard (1964), reportaram o uso de diluidores com 20% de gema de ovo, como o melhor resultado, e essa porcentagem parece ser o padrão usado por outros autores (FONTBONNE e BADINAND, 1993; RODRIGUES-MARTINES et al., 1993; NÖTHLING et al., 1995; SILVA et al., 1996).

Infelizmente, a concentração final de gema de ovo em extensores de sêmen é muitas vezes desconhecido, devido à variabilidade e às vezes ao não relato da taxa de diluição.

A fração lipoprotéica de baixa densidade contida na gema de ovo é formada por esferas de lipoproteínas que contem lipídios neutros de tamanho variável, rodeado de uma capa de lipoproteína composta principalmente de glicoproteínas e fosfolipídios, cujos grupos hidrófobos se orientam para o interior e os grupos hidrófilos para a superfície (EVANS et al., 1973). As lipoproteínas de baixa densidade se unem firmemente a membrana espermática, e esta ligação não se rompe após várias lavagens (WATSON, 1979)

Davies (1982) obteve melhores taxas de sobrevivência pós-descongelação incluindo 20% de gema de ovo, frente a 5% (v/v). No entanto, não encontrou diferenças significativas na motilidade pós-descongelação quando comparou taxas de 10 e de 20% (v/v), se bem que, nos resultados absolutos a motilidade pós-descongelação foi superior quando utilizava 20%.

D) FONTE DE ENERGIA:

A maioria dos extensores utilizados na criopreservação do sêmen canino contem glicose ou frutose (SILVA et al.,1996; HAY et al., 1997; ROTA, 1998). Investigações iniciais do metabolismo energético do sêmen fresco de cães incubados em glicose 10mM ou frutose indicou que a frutose é mais eficiente que a glicose na obtenção de níveis energéticos. Além disso, existem indicações que a frutose possivelmente tenha uma relação como um fator ativador do espermatozóide após a ejaculação (RIGAU et al., 2000).

E) ANTIBIÓTICOS:

Os ejaculados são estéreis, mas sua contaminação apartir do prepúcio, ureta 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 Estreptomina resulta numa preparação antibiótica eficaz e possivelmente a mais utilizada na elaboração de diluentes seminais (WATSON, 1979).

F) PH:

O pH da 2ª fração do ejaculado canino é de aproximadamente 6,2 (ROTA et al., 1995) e a 3ª fração, ou fluido prostático, é ligeiramente mais básico 6,8. O pH ótimo de um meio diluidor pode ser diferente em cada uma das etapas do processamento do

sêmen. Salisbury et al. (1978), observaram que as alterações pré-congelação eram menores quando o pH do diluente era de 6,5, mas a perda menor da motilidade espermática durante a congelação foi observada com pH=7,5.

O pH das soluções salinas tamponadas depende da temperatura que por sua vez sofre várias oscilações durante o processo de congelação. Durante o abaixamento de temperatura, os diferentes componentes do tampão alcançam seus respectivos pontos de corte e a solução vai se cristalizando (VAN DEN BERG e ROSE, 1959). Alguns pesquisadores têm titulado seus extensores a um pH de 6,8 (FOOTE, 1964), 6,7 (ROTA et al., 1995), 7,0 (SMITH e GRAHAM, 1984), 7,1 (THOMAS et al., 1993) e 7,4 (HAY et al, 1997).

G) ADIÇÃO DE GLICEROL E EQUILÍBRIO:

Desde que Polge et al. (1949), demonstraram a eficácia do glicerol, como crioprotetor universal, esta substância tem sido utilizada amplamente.

Durante o processamento do sêmen ocorrem movimentos bruscos de água e do crioprotetor nas células espermáticas, sendo possível que ocorram inclusive movimentos similares em cada subcompartimento celular (HAMMERSTEDT et al., 1990).

O movimento de água através das membranas é influenciado por:

- Existência de defeitos na membrana (VERKMAN e MASUR, 1988).
- A composição lipídica e as preferências de fase dos distintos lipídios (CARRUTHERS e MELCHIOR, 1988).

A adição de um diluidor contendo glicerol (concentração de 4%) comparado ao uso de diluidores sem glicerol mostrou uma diminuição no número de espermatozoides com capacidade de penetrar oócitos homólogos após a refrigeração, pré-congelação. Em um estudo conduzido por Fontbonne e Badinand (1993), onde examinaram a

temperatura na qual o glicerol foi adicionado (5°C x temperatura ambiente), o método de adição (uma ou várias etapas) e a concentração de glicerol, não verificaram diferença na motilidade pós-descongelação entre diferentes métodos de adição em qualquer temperatura, ou entre concentrações de glicerol compreendidas entre 3,2 ou 6,4%.

Peña et al. (1998), também verificaram que a temperatura de glicerolização não afetou a qualidade espermática pós-descongelação; entretanto, observaram que tanto a motilidade pós-descongelação como a integridade do acrossoma, foram superiores após o uso de um meio diluidor contendo 8% de glicerol quando comparado com 2,4 e 6%.

Vários períodos de refrigeração e equilíbrio (de 45min. a 5 hs) tem sido descritos para os canídeos (FONTBONNE e BADI NAND, 1993; SILVA et al., 1996).

De acordo com Watson (1979) e Jasko (1994), antes da congelação, os espermatozoides devem permanecer um determinado período de tempo a uma temperatura de equilíbrio, para que ocorra diminuição do metabolismo espermático e para que iniciem as interações com os componentes do meio diluidor antes do estresse do congelamento, diminuindo, dessa forma os riscos de um choque térmico. O período de equilíbrio ideal pode variar para cada espécie animal e para cada diluidor utilizado (CHACUR, 1996).

Olar et al. (1989), demonstraram que a melhor motilidade pós-descongelação foi conseguida quando o sêmen do cão foi refrigerado (de 37° a 5°C) por 1 hora e equilibrado a 5°C por 2 horas usando um extensor Tris-gema de ovo contendo 3 ou 4% de glicerol.

A concentração ótima de glicerol adicionada ao meio diluidor é um compromisso entre os efeitos de proteção e efeitos adversos. Nesse aspecto os canídeos parecem ser semelhantes a outras espécies de mamíferos, onde uma variação entre 2 e 8% de

glicerol é o padrão, com adição no início ou fim da refrigeração (OLAR et al., 1989; HAY et al., 1997).

H) CONGELAÇÃO:

A taxa de congelação usada na criopreservação do sêmen canino varia amplamente, e são dependentes do método de envasamento. Com raras exceções, os espermatozoides caninos são congelados em palhetas de 0,5ml (OLAR et al., 1989; ROTA, 1998) ou *pellets* (IVANOVA-KICHEVA et al., 1995). A comparação direta entre *pellets* e palhetas no método de congelação, não mostrou diferença na qualidade do sêmen canino pós-descongelação (ENGLAND, 1993). Poucos estudos sistemáticos sobre os efeitos da taxa de congelação na qualidade do sêmen canino têm sido realizados. Foote (1964) comparou as taxas de 0,8°C/min. e 3°C/min. entre 5 e -15°C, ambos seguidos de 5°C/min. entre -15°C e -40°C, e depois 10°C/min. de -40°C a -79°C, e demonstrou que as curvas de congelação mais lentas apresentavam uma sobrevivência espermática pós-descongelação melhor. Hay et al. (1997) encontraram uma melhor motilidade após congelação (de 0 a -70°C) com taxas médias de 12 e 28°C/min., comparados as curvas mais lentas de 0,5°C/min., e taxas mais rápidas de 99°C/min. e 214°C/min.

I) DESCONGELAÇÃO:

O benefício de taxas de descongelação rápidas ou lentas na qualidade espermática do cão não é claro; a comparação de dois protocolos de descongelação para sêmen canino em *pellets* incluíram: 55°C/5seg x 37°C/8seg., em solução de NaCl a 0,9%, resultou numa motilidade pós-descongelação de 29,3% x 26,1% e uma longevidade de 184,4 x 148,9 minutos para 55°C e 37°C respectivamente (IVANOVA-KICHEVA et al., 1995).

De acordo com Cunha (2002) a descongelação a 72°C/8seg. foi favorável ao sêmen canino congelado, segundo os protocolos de congelação em glicina-gema e Tris.

Vários autores vêm sugerindo que a descongelação de sêmen canino as altas temperaturas com curtos períodos de exposição proporciona melhores resultados de viabilidade e fertilidade; este fato deve-se provavelmente a diminuição dos riscos de recristalização dos microcristais intracelulares que podem ocorrer durante uma descongelação lenta (OLAR, 1984; IVANOVA-KICHEVA et al., 1995; PEÑA, 2000).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de reprodução artificiais vêm se desenvolvendo de forma mais lenta nos cães, a despeito da utilização da espécie como modelo experimental, do que nos animais de produção. Isto se deve, além de outras considerações, a particularidades da biologia reprodutiva da espécie canina, que dificulta e inviabiliza a transposição de conceitos e técnicas utilizadas nas outras espécies domésticas.

A congelação de sêmen e a sua utilização subsequente esbarram em detalhes inerentes a espécie, por exemplo:

- A baixa viabilidade espermática pós-descongelação
- Identificação do momento ideal da ovulação nas fêmeas;
- Técnicas de I.A. intra-uterina.

Esses fatores são provavelmente as causas que explicam a pequena difusão dessa biotécnica na espécie canina.

Até poucos anos atrás, poucos estudos eram realizados com o sêmen de cão; toda a tecnologia utilizada era proveniente de estudos feitos em bovinos. Hoje, ao contrário, existem muitos trabalhos sendo realizados, levando em conta as necessidades da célula espermática canina, estimulando a confecção de meios diluidores específicos e protocolos de congelação diferenciados.

Da mesma forma pesquisas realizadas nas fêmeas permitirão num curto espaço de tempo que barreiras importantes sejam ultrapassadas e que os resultados da I.A. com sêmen congelado na espécie seja uma realidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen Cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v.21, p.1-7, 2000.
- BATEMAN, H.L. **Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival.** Guelph, 2001. 5p. Thesis (master). University of Guelph.
- BATTISTA, M., PARKS, J., CONCANNON, P. Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, Tris or Test extenders. **Anim. Reprod. Sci.**, v.3, p.229-31, 1989.
- CARRUTHERS, A. e MELCHIOR, D.L. Effects of lipid environment on membrane transport. The human erythrocyte sugar transport protein/lipid bilayer system. **Am. Rev. Physiol.**, v. 50, p.557-71, 1988.
- CHACUR, M.G. **Avaliação da congelação de sêmen bubalino *Bubalus bubalis*, com os diluidores glicina-gema, triladyl e Tes em diferentes tempos de equilíbrio.** Botucatu, 1996. 117p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- CONCANNON, P.W., BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. (Ed). **Current veterinary therapy X.** Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989. p.1247-58.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP.** São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database.** Philadelphia, 1996. 468p.

- CUNHA, I.C.N. **Criopreservação do sêmen canino**. Botucatu, 2002. 119p. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- DAVIES, P.R. **A study of spermatogenesis, rates of sperm production, and methods of preserving the semen of dogs**. 1982. PhD. Thesis, University of Sidney, Australia.
- DE LEEUW, F.E., CHEN, H.C., COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A.J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v.27, p.171-83, 1990.
- DRAGILEVA, E., RUBINSTEIN, S., BREITBART, H. Intracellular Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in Bull and ram spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.61, p.1226-34, 1999.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.243-55, 1993.
- EVANS, R.J., BAUER, D.H., BANDEMER, S.L., VEGHEFI, S.S. e FLEGAL, C.L. Structure of egg yolk very lipoprotein and the role of lipovitellenin in the structure. **Archs Biochem. Biophys.**, v.154, p.493-500, 1973.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.
- FONTBONNE, A. e BADINAND, F. Studies on freezing dog spermatozoa. Effect of glycerol on motility after thawing. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.531-32, 1993.
- FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. **Am. J. Vet. Res.**, v.25, p.32-6, 1964.
- FOOTE, R.H., LEONARD, E.P. The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. **Cornell Vet.**, v.54, p.78-89, 1964.

- GAO, D.Y., ASHWORTH, E., WATSON, P.F., KLEINHANS, F.W, MAZUR, P., CRISTER, J.K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.49, p.112-23, 1993.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **J. Androl.**, v.11, p.73-88, 1990.
- HAY, M.A., KING, W.A., GARTLEY, C.J., LEIBO, S.P., GOODROWE, K.L. Effects of cooling, freezing, and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.51, p.99-108, 1997.
- IVANOVA-KICHEVA, M.G., SUBEV, M.S., BOBADOV, D.P., ROUSEVA, I.A. Effects of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.563-9, 1995.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars. Vet.**, v.10, p.156-65, 1994.
- JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OSLOM, P.N.S. Sexual differentiation and normal anatomy of the queen. In: _____. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. cap.24, p.389-95.
- KIM, Y.J., KIM, B.J. Studies on artificial insemination with canine semen frozen using methanol and preserved in liquid nitrogen. **Korean J. Vet. Res.**, v.12, p.207-14, 1995.
- KIM, Y.J., PARK, Y.J, KIM, B.J. Artificial insemination with frozen semen in the dog- simple freezing method using methanol. **Korean J. Vet. Res.**, v.34, p.851-5, 1994.
- LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh or frozen semen. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.39, p.299-310, 1989.

- LOPES, M.D., PAPA, F.O. Effects of different diluents and method of centrifugation for canine semen congelation. In: CONGRESS OF THE WORDL SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, v.23, 1998, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires, 1998. p.799.
- MANN, T. **The biochemistry of semen and of the reproductive male tract**. 2.ed. London: Methuen, 1964. 240p.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. **Am. J. Physiol.**, v.247, p. C125-42, 1984.
- MCGEE, H.A., MARTIN, W.J. Cryochemistry. **Cryogenics**, v.2, p.1-11, 1962.
- NÖTHLING, J.O., VOLKMANN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. **J. S. Afr. Vet Assoc.**, v.66, p.49-55, 1995.
- OLAR, T.T., BOWEN, R.A., PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.31, p.451-61, 1989.
- PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effects of Cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-22, 1992.
- PARRISH, J.J., SUSKU-PARRISH, J.L., GRAHAM, J.K. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: Role of intracellular calcium. **Theriogenology**, v.51, p.461-72, 1999.
- PEÑA, A.I., BARRIO, F., QUINTELA, L.A., HERRADÓN, P.G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-74, 1998.
- POLGE, C., SMITH, A.U., PARKS, A.S. A revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, v.164, p.666, 1949.
- RIGAU, T., CAMPRUBI, M., BADIÀ, J., BALLESTER, J., JESUS PALOMO, M., RIVERA, M., IZQUIERDO, D., PEÑA, A., RODRIGUEZ-GIL, J.E. Different effects of glucose and fructose on energy metabolism in dog sperm from fresh ejaculates. In: INTERN.

- CONG. ANIM. REPROD., 14, 2000. **Proceedings...** Stockholm: European Society for Study of Reproduction, 2000. p. 24.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., EKWALL, H., LINDE-FORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen spermatozoa. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.279-85, 1993.
- ROTA, A. **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa.** 1998, p.1-42. Thesis (Doctoral)-Uppsala Sweden: SLU Service/Reprod.
- ROTA, A., FRISHLING, A., VANNOZZI, I., CAMILLO, F., ROMAGNOLI, S.E. Effect of the inclusion of skim milk in freezing extenders on post-thaw viability of canine spermatozoa. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 4, 2000, Oslo. **Proceedings...** Oslo: University Press, 2000. p. 95.
- ROTA, A., STRÖM, B., LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. **Theriogenology**, v.44, p.885-900, 1995.
- ROWSON, L.E.A. Infertility of cow, sow and bitch. **Ir. Vet. J.**, v.8, p.216-21, 1954.
- SALISBURY, G.W., VANDEMARK, N.L. e LODGE, J.R. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. Principles and techniques of freezing spermatozoa. **Freeman and Company**, 2.ed. São Francisco, 1978. p. 494-554.
- SANTOS, S.E.C., VANNUCCHI, C.I., SATZINGER, S.A., ASSUMPÇÃO, M.E.O.D'A., VISINTINI, J.A. Comparison of five extenders for canine semen freezing. **Braz J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.36, 1999.
- SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. **AI Digest**, v.17, p.6-7, 1969.
- SILVA, L.D.M., ONCLIN, K., LEJEUNE, B., VERSTEGEM, J.P. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Vet. Rec.**, v.138, p.154-7, 1996.

- SILVA, L.D.M., VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intra-uterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.571-9, 1995.
- SMITH, F.O., GRAHAM, E.F. Cryopreservation of canine semen: Techniques and performance. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION, 10, 1984, Champaign-Urbana, 1984. v.2, p.216.
- THOMAS, P.G.A., LARSEN, R.E., BURNS, J.M., HAHN, C.N. A comparison of three packing techniques using two extenders for the Cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v.40, p.1199-205, 1993.
- VAN DEN BERG, L. e ROSE, D. Effects of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.81, p.319-29, 1959.
- VERKMAN, A.S. e MASUR, S.K. Very low osmotic water permeability and membrane fluidity in isolated toad bladder granules. **J. Membr. Biol.**, v.104, p.241-51, 1988.
- WATSON, P.F. Artificial insemination and the preservation of semen. In: LAMMING, G.E. (Ed). **Marshall's physiology of reproduction**, 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990. v.2, p.747-869.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of sperm and assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.871-92, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci**, v.60/61, p.481-92, 2000.
- WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. **Rev. Reprod. Biol.**, v.1, p.283-350, 1979.
- YU, X.L., PANG, Y.Z., LI, Y.H., WANG, Z.B. Study on freezing canine pellet semen by the new method of freezing in liquid nitrogen. **Chinese J. Vet. Sci.**, v.17, p.289-91, 1997.