

CONGELAMENTO DE SÊMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CÃES. REVISÃO

Saulo Fernandes Mano de Carvalho
Marco Túlio Carrijo Pereira
Tânia Berbert Ferreira Lima

CARVALHO¹, S.F.M.; PEREIRA², M.T.C.; LIMA³, T.B.F. Congelamento de sêmen e inseminação artificial em cães. Revisão. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 7(1): p. 49-52, 2004.

RESUMO: Foram utilizados para esta revisão trabalhos que estudassem o congelamento do sêmen canino. Os resultados na maioria das pesquisas constataram que o sêmen canino congelado é de baixa qualidade. Publicações relatam obtenção de melhores resultados utilizando o tris-frutose-ácido cítrico como diluidor, glicerol como crioprotetor, método de congelamento lento e descongelamento em água a 37°C.

PALAVRAS-CHAVE: cães, congelamento, inseminação artificial, sêmen

SEMEN FREEZING AND ARTIFICIAL INSEMINATION IN DOGS REVIEW

CARVALHO, S.F.M.; PEREIRA, M.T.C.; LIMA, T.B.F. Semen freezing and artificial insemination in dogs. Review. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 7(1): p. 49-52, 2004.

ABSTRACT: To make that review were used studies of freezing canine semen and some techniques. The major of studies discovered that the dog frozen semen has low quality. The best result was obtain when used the tris fructose citric acid diluent, whit glicerol as crioprotector, slow freezing metod and backed in water with 37°.

KEY WORDS: artificial insemination, freezing, dogs, semen

CONGELAMIENTO DEL SEMEN E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN PERROS REVISIÓN

CARVALHO, S.F.M.; PEREIRA, M.T.C.; LIMA, T.B.F. Congelamiento del semen e inseminación artificial en perros. Revisión. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 7(1): p. 49-52, 2004.

RESUMEN: Fue usado para se hacer la revisión, trabajos que estudiasen la congelamiento del semen de perros y sus técnicas. Los resultados en la mayor parte de las investigaciones mostraron que el semen canino es de baja calidad. El mejor resultados se obtuvo con utilización del triz frutose ácido cítrico como diluidor, y el glicerol como crioprotector y método de congelamiento despacio y descongelamiento en agua a 37°.

PALABRAS CLAVE: congelamiento, inseminación artificial, perros, semen

Introdução

O cão, além de ser um animal de companhia, é utilizado para caça, guarda, salvamento, tração e condução de deficientes visuais.

A reprodução desta espécie é pouco estudada se comparada a de animais de produção. No entanto, este é um campo fundamental para observação de vários problemas de ordem congênita e hereditária. O uso da inseminação artificial pode reduzir fronteiras, estocar material genético para necessidades futuras, utilizar material de cães que estão incapacitados para reprodução e gerar maior número de crias de um exemplar geneticamente superior, dentre outros benefícios.

Existem várias técnicas para o congelamento do sêmen canino. Porém, todas são derivadas daquelas utilizadas em

outras espécies, como bovinos, e não são padronizadas. Antes do congelamento propriamente dito, são várias as etapas realizadas, as quais são enfocadas nesta revisão de literatura, por isto objetivou-se revisar a literatura sobre a tecnologia de colheita, análise, diluição e congelamento do sêmen canino.

Colheita e análise do sêmen

Para colheita, pode-se utilizar a vagina artificial ou coleta manual. BARTLETT (1962), descreve que a técnica mais recomendada é a massagem manual do bulbo peniano, que se faz facilmente quando o pênis está semi ereto. O volume do sêmen de cães varia de acordo com a raça, sendo em média, de 1 a 30 ml. Um bom ejaculado possui coloração branca opalescente, pH entre 6,3 e 6,7, motilidade progressiva retilínea acima de 70%, e concentração espermática em torno de 3.000.000 por ml de sêmen.

¹ Médico Veterinário. Clínica Veterinária Mami & feras.saulovet@bol.com.br

² Médico Veterinário. Aluno especial do Programa de Mestrado em Ciências Veterinárias (COMEV) da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade federal de Uberlândia (UFU). Av. João Pinheiro 695, apto°400. Centro. Uberlândia-MG, Brasil. marcotulioarrijo@hotmail.com

³ Cirurgiã Dentista. Aluna COMEV. FAMEV. UFU.

Após a colheita é necessária a análise detalhada do ejaculado. São analisados o volume, cor, pH, motilidade progressiva retilínea e concentração total. O pH deve variar entre 6,3 a 6,7, e a motilidade deve estar acima de 70%. Porém, CONCANNON & BATTISTA (1989) descrevem que amostras com motilidade entre 50 e 65% não devem ser descartadas, quando o número total de espermatozoides esteja entre 100 e 400 milhões em uma dose inseminante.

Deve-se mergulhar o recipiente com o sêmen em banho-maria a 37°C, uma vez que esta é a temperatura normal do sêmen. Segundo CHRISTIANSEN & SCHMIDT (1988), o choque térmico é uma das maiores causas de insucesso na inseminação artificial, tanto com sêmen fresco ou congelado.

MOURA *et al.* (2002) estudaram o sêmen de 40 cães diferentes, com colheita realizada por estimulação manual. Observaram que mesmo mantido à 38°C a motilidade e o vigor dos espermatozoides decrescia gradualmente e uma redução acentuada destes parâmetros foi observada após 45 minutos.

Posteriormente, são feitas mensurações da concentração motilidade, vigor, e patologias espermáticas diversas. A concentração espermática é determinada com o auxílio de câmara hematimétrica, que é dividida em quadrantes. Deve-se contar os espermatozoides no quadrante central e outros cinco quadrantes. O cálculo respeita a profundidade da câmara e a diluição da pipeta. A motilidade e o vigor são avaliados em microscopia, com aumento de 100X. Atribui-se à motilidade valores de 0-100%, e para o vigor valores de zero e cinco. Os defeitos espermáticos podem ser observados pelo método de KARRAS (1996). Segundo SEAGER (1986), os defeitos estudados são: patologias espermáticas primárias como cabeça gigante, cabeça pequena, defeitos de acrossomo, formas duplas, cauda fortemente enrolada, cauda fortemente dobrada, gota citoplasmática proximal, defeitos de peça intermediária e inserções anormais de cauda. E também as patologias secundárias como gota distal, cabeça solta e cauda enrolada. CHRISTIANSEN & SCHMIDT (1988), CONCANNON & BATTISTA (1989), fizeram referência a uma observação minuciosa destes defeitos, uma vez que estes dados podem esclarecer problemas reprodutivos.

Diluição para congelamento

Depois da colheita e análise do sêmen a próxima etapa é a diluição. Um bom diluidor deve conter nutrientes energéticos, solução tampão, osmolaridade fisiológica, concentração de eletrólitos e antibióticos para prevenir eventual crescimento bacteriano. No diluidor deve-se incluir um crioprotetor, afim de proteger os espermatozoides do choque térmico durante o congelamento e descongelamento, estes substituem a água no interior das células, assim ao ser congelada as células não se rompem pela formação de cristais de gelo (CONCANNON & BATTISTA, 1989). As melhores diluições descritas foram as que utilizaram tris, citrato e glicina. A maioria dos experimentos utilizou glicerol como crioprotetor. O uso de etilenoglicol, usado em outras espécies, foi superior ao glicerol. Os trabalhos em cães iniciaram-se nos anos 50 e até o momento grande parte dos estudos se reportam ao glicerol e não ao etilenoglicol. SANTOS (1997) realizou experimento usando cinco diluidores: tris-frutose-ácido cítrico, lactose, tris-frutose-citrato, leite desnatado e

glicina, e glicerol como crioprotetor. A pesquisadora utilizou cinco ejaculados de seis cães. Depois da colheita e análise, o sêmen foi dividido em cinco alíquotas para diluição nos diferentes diluidores. O sêmen foi diluído à temperatura de 37°C, estabilizado cerca de uma hora e depois resfriado à temperatura de 5°C. O crioprotetor foi adicionado por gotejamento. Todo o conteúdo foi estabilizado por mais uma hora a 5°C. Posteriormente o material foi congelado em vapor de nitrogênio. O tris-frutose-ácido cítrico foi o diluidor que obteve as melhores índices de motilidade, seguido pela glicina. Os outros tratamentos não foram satisfatórios, com média 50% de motilidade progressiva retilínea após o descongelamento. A maioria dos meios utilizados pelos pesquisadores tem cerca de 20% de gema de ovo no meio diluidor e 8% de crioprotetor.

Leite esterelizado e tris-gema de ovo foram os diluentes testados por MOURA *et al.* (2002). Os diluentes foram misturados no sêmen a uma temperatura de 38°C, estabilizados por uma hora e depois refrigerados a 5°C. Então adicionou-se o glicerol como crioprotetor (7% do volume total), estabilizou-se por mais uma hora e criopreservou-se em nitrogênio líquido (-196°C). Os autores concluíram que o tris-gema de ovo determinou melhor viabilidade espermática comparado ao leite esterilizado.

SILVA *et al.* (2002) estudaram o sêmen de 12 cães de diferentes raças, com tris, tris-20% de gema de ovo, tris-6% de glicerol e tris-20% de gema de ovo- 6% de glicerol. Os diluentes foram adicionados ao sêmen e equilibrados à 4°C por 70 minutos. Depois congelados em nitrogênio líquido. Após uma semana o sêmen foi descongelado e analisada sua motilidade e morfologia. O descongelamento revelou uma motilidade espermática de 53,8±12,8, 34,2±16,6, 20,8±13,8 e 11,3±12,5 para tris-20% de gema de ovo- 6% de glicerol, tris-6% de glicerol, tris- 20% de gema de ovo, e tris ,respectivamente. O vigor espermático foi 3,6±0,6, 2,9±1,1, 2,4±1,2 e 1,1± 0,9 para os mesmos tratamentos, respectivamente. O tris-20% gema de ovo -6% de glicerol foi superior aos outros tratamentos.

Para boa diluição adequada, YUBI *et al.* (1987), relataram que é necessário determinar o número total de espermatozoides do ejaculado. Dependendo da concentração, a diluição do sêmen pode ser de 1:1, 1:2 ou até 1:5. O objetivo final é buscar uma dose mínima de 100 milhões de espermatozoides.

Resfriamento e equilíbrio

Devido a falta de padronização da metodologia dos trabalhos com sêmen canino, não há estudos conclusivos sobre o tempo referente ao equilíbrio e resfriamento. A maioria dos pesquisadores sugere que após diluído o sêmen deve repousar por cerca de uma hora. A partir daí, o material deve ser resfriado a 5°C e permanecer nesta temperatura por mais uma hora (FARSTAD, 1996). Outros autores recomendam o equilíbrio com um resfriamento lento por 45 minutos seguido de repouso por mais 30 minutos a 3°C (DOBRINSK *et al.*, 1993). OLAR & BOWEN & PICKETT (1989), citam que a taxa de resfriamento deve ser de 5°C por minuto entre 5 a -15°C, e de 20°C por minuto entre -15 a -100°C. Estes detalhes são amplamente discutidos e cada pesquisador utilizou metodologia própria, fugindo de uma padronização.

Após estabilização do sêmen, deve-se realizar o

envasamento. DOBRINSK *et al.*, (1993) sugerem o envasamento em palhetas de 0,25 ml e 0,5 ml. A técnica consiste em encher a palheta utilizando seringa graduada e álcool polivinílico para vedação. É necessária a identificação completa da palheta, com nome do reprodutor, raça, partida, data de congelamento, diluidor utilizado e responsável técnico. As palhetas plásticas são preferidas, em relação as ampolas de vidro, pela facilidade de manuseio.

Congelamento

O congelamento do sêmen determina a sobrevivência espermática e a fertilidade. CONCANNON & BATTISTA (1989), comprovaram que o congelamento rápido leva a formação de cristais de gelo intracelulares e danos às membranas que levam ao rompimento das organelas citoplasmáticas. Por sua vez, o congelamento lento causa dano celular por alteração da osmolaridade, formando cristais de gelo extra celulares, com enrugamento celular e mudanças na osmolaridade, dependendo do diluidor e crioprotetor utilizados.

O sêmen canino é dividido em três frações (I, II, e III). As frações I e III contêm basicamente secreções prostáticas, e a fração II é rica em espermatozoides. Para o sucesso do congelamento alguns autores fracionam o sêmen em centrifuga desprezando as frações I e III, utilizando somente a fração II. SANTOS (1997) relataram que as frações I e III poderiam afetar negativamente a motilidade espermática por longos períodos à temperatura de 37° C. Portanto seria interessante utilizar-se somente a fração II do ejaculado.

RODRIGUEZ-MARTINEZ & LINDE-FORBERG (1992) realizaram estudo utilizando microscopia eletrônica de varredura e eletromicroscopia de transmissão. Analisaram material congelado com tris-frutose-ácido cítrico, contendo 20% de gema de ovo e 8% de glicerol. As observações revelaram que a maioria dos espermatozoides apresentavam dobras do plasmalema nas regiões do acrossomo e na peça intermediária. As maiores mudanças foram perdas de organelas, perda do material eletrodense do acrossomo, perda de componentes da cromatina dos espermatozoides, como enxofre e fósforo, rarefação e edema de acrossomo.

Depois de congelado, o sêmen é estocado em botijão criobiológico com nitrogênio líquido. Deve-se identificar as raques e canecas com número de partida e nome do reprodutor utilizado, para facilitar ainda mais o manuseio do material (ENGLAND, 1993).

Descongelamento e avaliação da qualidade do sêmen para inseminação artificial

Para o descongelamento, LINDE-FORSBERG (1995) sugere colocar o material em banho maria a 37°C, por 15 a 60 segundos. ALLEN (1993) descreveu em sua técnica o descongelamento do sêmen em água a 70°C por oito segundos, observando a motilidade espermática ser superior a 50%. CHRISTIANSEN & SCHMIDT (1988) e CONCANNON & BATTISTA (1989), indicaram que o descongelamento rápido é melhor do que o lento em relação a maior taxa de motilidade retilínea progressiva dos espermatozoides. As técnicas são bastante discutidas devido à falta de padronização da metodologia dos estudos, dificultando assim a comparação dos resultados.

As técnicas de inseminação artificial de cadelas são

variadas. As mais citadas são a intravaginal e intra-cervical, na qual o sêmen é depositado o mais próximo dos cornos uterinos. Utiliza-se também cateterismo da cérvix por endoscopia. BROWN (1992) descreveu que a inseminação intravaginal é realizada com sonda de metal ou plástico (a mesma usada em inseminação artificial de bovinos). O sêmen é aspirado em seringa e injetado com certa quantidade de ar. Esta técnica é considerada mais prática que a intra-cervical. Os resultados obtidos pela técnica intra-cervical são mínimos, assim sua utilização tem maior custo e as variações estatísticas são pequenas em relação às outras técnicas.

De modo geral a taxa de fertilidade do sêmen congelado de cães é baixa em comparação ao sêmen fresco, estando relacionada com a má penetração do espermatozoide no oócito (ENGLAND, 1993).

Comentários

Os estudos realizados utilizaram metodologias diferentes com aplicação de métodos usados em outras espécies animais. Mais estudos são necessários, afim de melhorar a qualidade do sêmen canino congelado.

Referências

- ALLEN, W.E. *Inseminación Artificial, Fertilidad y Obstetricia canina*, Zaragoza: Acribia. 236p. 1993.
- BARTLETT, D.J. Studies on dog semen. Morphological characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 3, n.2, p.173-189, 1962.
- BROWN, R. M. Update of artificial insemination with fresh, chilled and frozen semen. *Problems in Veterinary Medicine*, Philadelphia, v.4, n.3, p.445-452, 1992.
- CHRISTIANSEN, I.J.; SCHMIDT, M. Deep freezing of dog semen: Preliminary report. *Kongelige Veterinaerog Landbohojskole, Sterilitestestfarking*, v.23, n.67, p.69-75, 1988.
- CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: *Kirk, Current Veterinary Therapy, small animal practice*, Philadelphia, W.B: Saunders (10ed), p.1247-1259, 1989.
- DOBRINSKI, I.; LULAI, C.; BARTH, A. D.; POST, K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post thaw of dog semen. *Journal of Reproduction and Fertility: (Suppl. 47)*, Cambridge, p.291-296, 1993
- ENGLAND, G.C.W. The criopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility: (Suppl. 47)*, Cambridge, p.243-255, 1993.
- FARSTAD, W. Semen criopreservation in dog and foxes. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.12, p.145-50, 1996.
- KARRAS, A. *Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte: CBRA, p. 55-57. 1996.
- LINDE-FORSBERG, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen thawed semen in dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery: Small Animal*, Saint Louis, v.10, n.1, p.48-58, 1995.

- MOURA, C. S.; CAVALCANTI, M.C.O.; GERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M.; BARRETO, M.B.P. In vitro evaluation test and dog semen's freeze with different extenders. *Revista Brasileira de Ciência veterinária*, Niterói, v.9, n.2, p. 102-106, 2002.
- OLAR, T.T.; BOWEN, R.A.; PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, New York, v. 31, n.2, p.451-461, 1989.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LINDE FORBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility: (Suppl. 47)*, Cambridge, p. 279-285, 1992.
- SANTOS, S.E.C. *Comparação entre cinco diluidores na congelação do sêmen de cães*. São Paulo. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997.
- SEAGER, S. W. J. Artificial insemination in dogs. In: BURKE, T.J. *Small Animal Reproduction and Infertility*, Philadelphia: Lea & Febiger, p.207-217, 1986.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M.; Effect of tris buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *Veterinary journal*, London, v. 164, n.3, p. 244-246, 2002.
- YUBI, A.C.; FERGUSON, J.M.; RENTON, J.P.; HARKER, S.; HARVEY, M.J.A.; BAGYENJI, B.; DOUGLAS, T. A. Some observation on the dilution, cooling and freezing of canine semen. *Journal of Small Animal Practice*, London, v.28, n.8, p.753-761, 1987.

Recebido para publicação em 30/08/2002.

Received for publication on 30 August 2002.

Recibido para publicación en 30/08/2002.

Aceito para publicação em 10/11/2003.

Accepted for publication on 10 November 2003.

Acepto para publicación en 10/11/2003.