

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CÃES

(Cryopreservation of semen and artificial insemination in dogs)

Daniel Couto UCHOA¹, Ticiania Franco Pereira da SILVA¹, Antônio Cavalcante Mota FILHO¹, Lúcia Daniel Machado da SILVA¹

¹Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Faculdade de Veterinária- Universidade Estadual do Ceará (UECE)- Fortaleza, CE

*E-mail: danielcouthochoa@terra.com.br

RESUMO

Diante de um crescente mercado que requisita produtos e serviços para cães, o presente trabalho objetiva descrever as principais etapas e resultados obtidos na criopreservação de sêmen e inseminação artificiais na espécie canina.

Palavras-chave: sêmen, cães, inseminação artificial.

ABSTRACT

Faced with a growing market that demands products and services for dogs, this paper aims to describe the main steps and results in cryopreservation of semen and artificial insemination in dogs.

Key-words: sperm, dogs, artificial insemination.

INTRODUÇÃO

O crescente mercado cinófilo vem buscando de melhores serviços e produtos para que cães de estimação e de alto valor zootécnico para que estes tenham oportunidade de

produzir um maior número de descendentes. Nas duas últimas décadas, a procura por parte de criadores profissionais por biotécnicas que visem à otimização do potencial reprodutivo de cães com características zootécnicas desejáveis é crescente. No Brasil, muitas vezes, pode tornar-se inviável financeiramente o transporte de animais, tendo-se em vista o valor cobrado pelo transporte aéreo de cães de raças grandes ou gigantes, já que este é por peso ou cubagem da caixa de transporte. Diante destes problemas, pode-se recorrer ao uso da inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado ou congelado com custos bem inferiores quando comparados com o transporte aéreo, a hospedagem e acompanhamento reprodutivo da fêmea longe de casa. A possibilidade da instalação de bancos de sêmen para uma maior difusão de material genético, além de armazenar o sêmen de grandes reprodutores para o uso posterior mesmo após a morte deste animal abre grandes perspectivas para criadores que trabalham com o melhoramento genético canino (Silva et al., 2004; Uchoa et al., 2007).

A IA possibilita a eliminação do estresse causado pelo transporte dos animais no momento do acasalamento de cães saudáveis, quando estes se encontram em regiões geograficamente distintas. Além de proteger machos valiosos da contaminação por doenças sexualmente transmissíveis e é utilizada nos casos de não reconhecimento do macho pela fêmea, ou vice-versa, nos casos de agressividade inerente à raça e desproporção sexual com relação ao peso. Pode-se ainda usar a IA a fim de diminuir a consanguinidade e taras hereditárias, ou nos casos de ejaculação precoce de animais jovens ou idosos. A IA permite otimizar o sêmen de um reprodutor para diversas fêmeas e perpetuar o material genético de animais de alto valor afetivo ou zootécnico, assim como de canídeos selvagens (Uchoa et al., 2002bc; Silva et al., 2004; Uchoa et al., 2007).

Principais resultados de criopreservação e inseminação artificial em cães

A tecnologia de reprodução assistida em cães teve início no século XVIII. Spallanzani, em 1776 (*apud* Watson, 1979), foi o primeiro a registrar que uma diminuição na temperatura proporcionava uma redução, de forma reversível, na atividade metabólica do espermatozoide, permitindo assim o seu armazenamento. Na espécie canina, o primeiro estudo relacionado à criopreservação do sêmen de cães é

descrito por (Rowson, 1954). A primeira IA, cientificamente registrada, foi realizada na espécie canina e descrita por Spallanzani em 1780 (*apud* Badinand et al., 1990) com sêmen a fresco. No entanto, o relato de nascimento de filhotes da espécie canina utilizando sêmen criopreservado só foi notificado muitos anos mais tarde (Seager, 1969). No Brasil, essa biotecnologia foi descrita com sucesso, através da inseminação artificial (IA) com sêmen canino criopreservado a pouco mais de 30 anos, tendo sido obtida uma ninhada de seis cães normais da raça Boxer (Vaske *et al.*, 1981).

Nos últimos anos diversos trabalhos demonstram que a criopreservação do sêmen para fins de reprodução assistida têm se tornado cada vez mais frequente (Nizanski, 2006 ; Thomassen *et al.*, 2006 ; Rota *et al.*, 2010; Uchoa, 2011), evitando-se dessa forma, a eliminação do estresse causado pelo transporte dos animais, bem como os custos com o deslocamento aéreo de cães de raças grandes ou gigantes (Uchoa, 2011).

No entanto, o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparada com o sêmen fresco. Mudanças de temperatura e a formação e dissolução de cristais de gelo e suas consequências, são exemplos dos maiores estresses da criopreservação que promovem injúrias às organelas celulares (Watson, 1995). Considerando isto, o meio diluente, juntamente com os crioprotetores, é utilizado com o intuito de proteger os espermatozóides dos choques térmicos e osmóticos que ocorrem durante o processo de congelamento (Castelo et al., 2008).

Para a refrigeração e congelamento seminal, faz-se necessário o uso de diluentes para a conservação da qualidade seminal por um período que pode variar de horas a anos. Estes são meios isotônicos (pH e osmolaridade compatíveis com o plasma seminal), de baixa toxicidade e que favorecem a sobrevivência espermática. Para seu uso em larga escala, devem ser de fácil preparo e baixo custo. Vários diluentes têm sido usados para a refrigeração e a congelamento de sêmen canino, dentre os quais podem ser citados: citrato (Harrop, 1962), leite desnatado (Uchoa et al, 2007), TRIS (Dorado et al., 2011; Shah et al., 2011; Kim et al., 2012), Lactose (Seager, 1969), Clone (Ström, 1997), Kenney (Uchoa et al, 2007), Laiciphos 478[®], o Biociphos W482[®] (Silva & Versteegen, 1995), e o diluente à base de água de coco in natura- DBAC (Uchoa et al., 2004) e em pó (ACP-106 e ACP-106c) (Uchoa, 2004; Uchoa, 2011; Uchoa et al, 2011).

Nos meios de diluição para a criopreservação de sêmen, faz-se necessário o uso de substâncias crioprotetoras que protejam a célula espermática dos danos causados durante o equilíbrio, congelação e descongelação (Concannon & Battista, 1989). Os crioprotetores podem ser penetrantes e não penetrantes. A gema de ovo que é considerada um não penetrante, restauram os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento (Hammerstedt et al., 1990), em substituição a gema de ovo temos o hidroxitolueno butilato (Neagu *et al.*, 2011) e lipoproteínas de baixa densidade (Moussa *et al.*, 2002). Já os crioprotetores penetrantes utilizados para a criopreservação de sêmen são: glicerol (Uchoa, 2011), etilenoglicol (Rota *et al.*, 2010), dimetilformamida (Lopes *et al.*, 2009; Mota-Filho *et al.*, 2011) e o dimetilsulfóxido (Medeiros *et al.*, 2002). Dentre estes, sem dúvida nenhuma, o glicerol tem sido o crioprotetor de eleição para criopreservação do sêmen canino.

Diversas metodologias têm sido descritas para a criopreservação 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 criopreservação (Silva et al., 2001). A técnica descrita por Andersen (1975) tem sido a mais usada. Nesta técnica, foi realizada a diluição do sêmen a 37 °C em Tris acrescido de 20% de gema de ovo e 8% de glicerol. Em seguida, foi procedido um período de equilíbrio de três horas, seguido do envase em palhetas plásticas de 0,5 mL e a exposição aos vapores de nitrogênio para criopreservação. Essa técnica tem servido como base para trabalhos onde têm sido realizadas pequenas modificações, alcançado bons resultados *in vitro* (Ström et al., 1997) e *in vivo* (Linde-Forsberg et al., 1999; Rota et al., 1999; Tsutsui et al., 2000; Uchoa, 2011). Uma recente técnica descreve a congelação do sêmen em gotas de 33 x 10⁶ spz/ mL microencapsulado em matriz celular de alginato alginato de sódio 1,5%, sendo uma alternativa para melhorar a motilidade e viabilidade do sêmen canino descongelado (Shah et al., 2011).

Algumas investigações científicas levantam a hipótese que os espermatozoides criopreservados sofrem mais alterações durante a descongelação do que durante o processo de congelação (Rota et al., 1998). De acordo com Hammerstedt et al. (1990), caso a taxa de congelação usada seja rápida, deve-se utilizar uma descongelação rápida, para ocorrer à dissolução dos cristais de gelo que se formaram durante o processo de

congelamento, antes que ocorra a recristalização temporária, que causaria danos à membrana plasmática e organelas celulares.

Atualmente existem vários protocolos preconizando diferentes temperaturas e velocidades de descongelamento para o sêmen canino. Silva et al. (1998) sugerem que a temperatura de 37 °C por 60s, em banho maria, promove uma menor porcentagem de alterações morfológicas espermáticas do que a de 50 °C por 30s.

Por razões práticas o sêmen congelado de cães é frequentemente, descongelado a 37 °C, embora muitos pesquisadores (Dobrinski et al., 1993; Rota et al., 1998) tenham encontrado que temperaturas mais altas aumentam a viabilidade após a descongelamento. Esse fato deve-se, provavelmente, a diminuição dos riscos de recristalização dos microcristais intracelulares que podem ocorrer durante descongelamento lenta (Ivanova-Kicheva et al., 1995; Peña, 2000).

As taxas médias de gestação já relatadas são variam em função do tipo de conservação seminal e a via de inseminação utilizada. Os principais resultados comparativamente ao sêmen a fresco encontram-se listados no quadro abaixo (Quadro 1).

As doses inseminantes utilizadas também são bastante variadas. Para sêmen a fresco, relata-se de 150 a 300 milhões (Silva et al., 1996; Nizański, 2006). Pinto et al. (1999) relataram o uso de 260 a 350 milhões de espermatozoides móveis totais para IA intra-vaginal com sêmen refrigerado, e para o sêmen congelado-descongelado, relata-se de 100 a 700 milhões (Seager et al., 1975; Olar et al., 1989; Silva et al., 1996; Nizański, 2006; Fukushima et al., 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma série de resultados já foram obtidos sobre o tema criopreservação e inseminação artificial na espécie canina, entretanto muitas pesquisas ainda são necessárias para padronização e otimização dos protocolos e obtenção de resultados mais próximos ao obtidos com sêmen a fresco.

Quadro 1: Taxas médias de gestação relacionadas ao tipo de conservação seminal, via de inseminação e diluidor utilizado (Uchoa, 2011- modificado).

Tipo de Sêmen	Tipo de IA	Taxa Gestação (diluidor)	Referência
Fresco	Intra-vaginal	81,8% (c/ pipeta bovina)	Nizański (2006)
		86,2% (c/ sonda Osíris)	
		91,0% (ACP-106)	Uchoa (2004)
		97,0% (DBAC)	
		90% (ACP-106c)	Uchoa et al. (2011)
Refrigerado	Intra-vaginal	90-100% (tris)	Pinto et al. (1999)
		80% *	Uchoa et al. (2007)
		90% (ACP-106c)	Uchoa et al. (2011)
Congelado-Descongelado	Intra-vaginal	100% (tris)	Rota et al. (2009)
		52,6% (tris)	Fontbonne e Badinand (1993)
		59,4% (tris)	Nizański (2006)
		60% (ACP-106c)	Uchoa (2011)
	Intra-uterina	73% (tris)	Fontbonne e Badinand (1993)
	Intra-uterina (laparoscópica)	60% (Laiciphos e Tris)	Silva et al. (1996)
	Intra-uterina (laparoscópica)	100% (Biociphos)	
	Intra-uterina (transcervical)	75% (tris)	Thomassen et al. (2006)

*diferentes diluidores: ACP-106, tris, Kenney e leite desnatado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*, 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. *Elevage et Insémination*, v. 239, p. 3-15, 1990.
- CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.3, p.67-75, 2008.
- CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK R.W. *Current veterinary therapy*. Philadelphia: WB Saunders, 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 viability of dog semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 47, p.291–296, 1993.
- DORADO, J.; ALCARÁZ, L.; DUARTE, N.; PORTERO, J.M.; ACHA, D.; HIDALGO M. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm[®] gradient. *Animal Reproduction Science*, v.125, p. 211– 18, 2011.
- FONTBONNE, A.; BADINAND, F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 47, p.325-327, 1993.
- FUKUSHIMA, F.B.; MALM, C.; HENRY, M.; GHELLER, V.A.; SERAKIDES, R.; NEVES, M.M.; MACEDO, S.P.; FIGUEIREDO, M.S.; ANDRADE, M.E.J.; CHAVES, M.S.; SILVA, M.X.; REZENDE, C.M.F.; MELO, E.G. Site of intrauterine artificial insemination in the bitch does not affect sperm distribution within in uterus. *Reproduction Domestic Animals*, v.45, p.1059-1064, 2010.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v.11, p.73-88, 1990.

- HARROP, A.E. Artificial insemination in the dog. In: MAULE, P.T. The semen of animals and artificial insemination. Weybridge: Commonwealth Agricultural Bureau, 1962, p.304-315.
- 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.563-569, 1995.
- KIM, S.; LEE, Y.; YANG, H.; KIM, Y. J. Rapid freezing without cooling equilibration in canine sperm. *Animal Reproduction Science*, v.130 p. 111– 18, 2012.
- LINDE-FORSBERG, C.; STRÖM-HOLST, B.; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal versus intrauterine insemination of frozen–thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*, v.52. v.11–23, 1999.
- LOPES, R.F.; COSTA, L.L.M.; LIMA, G.L.; SOUZA, A.L.P.; SILVA, A.R. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine. *Theriogenology*, v.72, p. 650-654, 2009.
- MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A., Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, v.58, p.273-276.2002.
- MOTA FILHO, A.C.; TELES, C.H.A.; JUCÁ, R.P.; CARDOSO, J.F.S.; UCHOA D.C.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology*, v. 76, p.1367–72. 2011.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.
- NEAGU, V.R.; MACÍAS-GARCÍA, B.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; MORILLO-RODRÍGUEZ, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; TAPIA, J.A.; PENÁ, F.J. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology*, v.73, p. 645–50, 2011.
- NIZAŃSKI, W. Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology*, v. 66, n. 2, p. 470-83, 2006.

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*, v. 31, p. 451-461, 1989.

PEÑA, A.I. 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. 1 (Thesis), Doctora Universidad de Santiago de Compostela, Uppsala., 2000.

PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, v. 52, p. 609-616, 1999.

ROTA A, LINDE-FORSBERG C, VANNOZZI J, ROMAGNOLI S, RODRIGUES-MARTINEZ H. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. *Reprod Dom Anim*. v. 33, p. 355-361, 1998.

ROTA, A.; MILANI, C.; ROMAGNOLI, S.; ZUCCHINI, P.; MOLLO, A. Pregnancy and conception rate after two intravaginal insemination with dog semen frozen either with 5% glycerol or 5% ethylene glycol. *Animal Reproduction Science*, v.118, p.94-97, 2010.

ROTA, A.; PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlorthetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science*. v.57, p. 199-215, 1999.

ROWSON, L.E.A. Infertility of cow, sow and bitch. [Irish Veterinary Journal](#), v.8, p.216-21, 1954.

SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *Artificial Insemination Digest*, p.17-26, 1969.

SEAGER, S.W.J.; PLATZ, C.C.; FLETCHER, W.S. Conception rates and related data using frozen dog semen. *Journal of Reproduction and Fertility*., v. 45, p.189-192, 1975.

SHAH, S.; OTSUKIB, T.; FUJIMURAB, C.; YAMAMOTO, N.; YASUHISA, Y.; HIGAKIB, S. HISHINUMAB, M. Cryopreservation of microencapsulated canine sperm. *Theriogenology*, v.7, p. 679–86, 2011.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S., SILVA, L. D. M. Efeito do processo de descongelamento sobre a viabilidade do sêmen canino *in vitro*. *Ciência Animal*, v. 8, p.75-80, 1998.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Efeito das etapas do processamento de criopreservação sobre a qualidade do sêmen canino diluído em Tris. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, p.474-474, 2001.

SILVA, A.R.; SATZINGER, S.; LEITE, L.G.; SILVA, L.D.M. Gestação obtida por inseminação artificial com sêmen canino refrigerado transportado à distância – relato de caso. *Clínica Veterinária*, n. 50, p. 56-64, 2004.

SILVA, L. D. M.; ONCLIN, K; LEJEUNE, B.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Veterinary Record*, v. 138, p. 154-157, 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, n. 4, p.571-579, 1995.

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.; FUGNER, J. A.; BERG, K.A.; 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.; TANAKA, A.; FUJIMURA, N.; HORI, T.; KAVAKAMI, E. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk Tris-fructose citrate. *Japanese Veterinary Medical Science*. v. 62, p. 603-606, 2000.

UCHOA, D. C. Água de coco em pó (ACP-106c) como diluente para conservação de sêmen e inseminação artificial na espécie canina. 2011. 195f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

UCHOA, D.C. Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluidores à base de água de coco. 2004. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

UCHOA, D.C.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Comparação de diferentes diluidores de sêmen na inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer. In: Simpósio Cearense de Ciência Animal, 4., 2002, Fortaleza. *Ciência Animal*, 2002a. v. 12. p. 131-134.

UCHOA, D.C.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer com diferentes diluidores de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Supl., n. 5, p. 150-152, 2002b.

UCHOA, D.C.; SATZINGER, S.; AMARAL, M.C.; SILVA, L.D.M. O uso de diferentes diluidores para inseminação artificial com sêmen canino refrigerado. In: *Anais...Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*. Curitiba, Paraná. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.182, 2007.

UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; CARDOSO, J.F.S.; MOTA-FILHO, A.C.; JUCÁ, R.P.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Favoring birth of female puppies after artificial insemination using sêmen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). *Theriogenology*, 2001, *in press*, doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.029.

VASKE, T. R.; MORAES, H. F.; ROMÃO, A.R.; BLASI, A.C.; PERASSI, P.; AUN, G.C. Seis cães normais nascidos de sêmen congelado. *A Hora Veterinária*, v.1, p.15 – 18, 1981.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v.7, p.871-891, 1995.

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. *Oxford Reviews Reproduction and Biology*. v. 1, p. 183-350, 1979.