



## Congelamento de sêmen e sua eficiência na inseminação artificial de cães

*Semen freezing and its efficiency in the artificial insemination in dog*

V.H. Chirinea, C.C. Sicherle, M.D.Lopes<sup>1</sup>

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista,  
Botucatu, SP, Brasil.

Correspondência: [denise@fmvz.unesp.br](mailto:denise@fmvz.unesp.br)

### Resumo

A fisiologia reprodutiva da espécie canina e a resposta insatisfatória do sêmen do cão à técnica da congelação são os dois maiores empecilhos aos esforços para o avanço da inseminação artificial em cães. Inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas nessa área, gerando muitas informações, sobretudo na tecnologia de sêmen. O objetivo desse texto é discutir os principais avanços na avaliação e congelação de sêmen e sua influência nos resultados de inseminação artificial.

**Palavras-chave:** inseminação artificial, congelação de sêmen, cães.

### Abstract

*The canine reproductive physiology and unsatisfactory results on techniques of frozen dog semen has been the biggest barrier on the improvement of artificial insemination in dogs. Many researches are been done in this area generating a lot of information, especially on semen technology. The aim of this text is to discuss the major advances on semen evaluation and semen frozen and its influence on artificial insemination results.*

**Keywords:** artificial insemination, semen frozen, dogs.

### Introdução

Os primeiros relatos da inseminação artificial (IA) em cães, após os trabalhos iniciais de Spallanzani no final do século XVIII, iniciaram-se no final de 1950, com o uso de sêmen fresco. A descrição da utilização de sêmen congelado ocorreu na década de 60 e somente nos anos 80 e 90 essa técnica foi introduzida na clínica reprodutiva, particularmente nos EUA e em países do norte da Europa (Foote, 2002; England e Millar, 2008). A fisiologia reprodutiva da espécie canina e a resposta insatisfatória do sêmen do cão à técnica da congelação foram os dois maiores empecilhos aos esforços iniciais para o avanço da IA em cães. Inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas nessa área, gerando muitas informações, sobretudo na tecnologia de sêmen. Atualmente, como consequência da demanda em tecnologias reprodutivas, a IA com sêmen fresco e resfriado é um serviço oferecido de rotina na clínica de pequenos animais.

Segundo Linde-Forsberg (2005), de todos os procedimentos de IA realizados em cães na Europa, 50 a 55% são realizados com sêmen fresco, 10% com sêmen resfriado e 35 a 40% com sêmen congelado. No Brasil, a despeito da ausência de estatísticas precisas, a rotina de IA com sêmen fresco é maior quando comparada com sêmen resfriado, e a inseminação artificial com sêmen congelado se restringe praticamente a laboratórios de pesquisa. Cada tipo de sêmen apresenta possibilidades distintas de aplicação, assim como também exige um manejo de complexidade diferente. A IA com sêmen congelado requer o desenvolvimento de metodologia adequada de congelação, mas, pesquisas realizadas nessa área, indicam que, em um futuro próximo, bancos de sêmen congelado estarão disponíveis (Stornelli et al., 2001).

A IA em cães é realizada basicamente por duas técnicas: intravaginal e intrauterina. A IA intravaginal consiste na deposição do sêmen na vagina da cadela e apresenta-se como a via de escolha, na maioria das vezes por ser de fácil execução e por oferecer bons resultados. Nesse caso, pode-se utilizar uma pipeta rígida, geralmente usada para IA em bovinos, ou a sonda de Osiris (Silva et al., 2003).

A IA por via intrauterina consiste na deposição do sêmen diretamente no interior do útero. Várias abordagens têm sido realizadas com o intuito de se desenvolverem técnicas nas quais a deposição do sêmen é realizada diretamente dentro do útero da fêmea, por via transcervical ou por meio de procedimentos cirúrgicos transabdominais, como a laparotomia e a laparoscopia (Linde-Forsberg, 2002; Silva et al., 2003).

A maioria dos autores tem obtido bons resultados utilizando IA intrauterina (mediante laparotomia, laparoscopia ou cateterismo cervical) com o uso de sêmen congelado. As porcentagens de prenhez obtidas com o uso de IA intrauterina variam de 60 a 90% (Tsutsui et al., 2000; Linde-Forsberg, 2002; Kim et al., 2007). Os resultados obtidos por esses autores são muito variáveis e essa variação pode ser explicada pela utilização de



diferentes meios diluentes, métodos de congelação, descongelação e envasamento.

Tsutsui et al. (2000) reportaram que o uso de IA intravaginal com sêmen congelado requer, no mínimo,  $20 \times 10^8$  espermatozoides móveis para que a fertilidade possa ser comparada com a obtida em acasalamento natural. Já com sêmen descongelado e depositado no útero, a dose inseminante sugerida foi de aproximadamente  $1,5$  a  $2,0 \times 10^8$  espermatozoides móveis e a taxa de gestação nesse estudo variou de 20 a 90%.

Linde-Forsberg et al. (1999), obtiveram uma taxa de gestação de 57,9%, ao usarem IA intra-uterina com  $100$  a  $400 \times 10^6$  espermatozoides. Kim et al. (2007) demonstraram taxa de gestação de 100% após IA intrauterina com baixo número de espermatozoides,  $50 \times 10^6$  espermatozoides móveis, de 80% com  $5 \times 10^6$  espermatozoides móveis, e de 0% com  $5 \times 10^5$  espermatozoides móveis.

Taxas de concepção com sêmen congelado têm sido obtidas por algumas instituições de pesquisa que utilizam como meios diluentes o TRIS/gema de ovo/frutose/citrato (Andersen, 1972; Rota et al., 1999), o Triladyl (Nöthling e Volkmann, 1995), o Laiciphos (Silva e Versteegen 1995) e o CLONE (Strön et al., 1997). A composição de alguns desses meios não é revelada. Com relação ao local de inseminação, ambas, intravaginal e intra-uterina são realizadas e uma taxa de concepção alta tem sido relatada em alguns desses trabalhos. Entretanto, é reconhecido que a congelação do sêmen de cão ainda não é uma prática rotineira.

Tabela 1. Esquema de IA em cães, de acordo com o tipo de sêmen utilizado.

Sêmen	Dose	Sobrevivência espermática	Esquema de IA	Fertilidade
Fresco	$150$ a $200 \times 10^6$ sptz/mL (diluído).	4 a 6 dias	3 inseminações a cada 48 horas ( $P_4 = 4$ ng/mL). Dias 1 a 4 pós- ovulação. ( $P_4 = 8$ a $15$ ng/mL).	80 a 90% (deposição transcervical ou fundo de vagina)
Resfriado	$150$ a $200 \times 10^6$ sptz/mL (diluído).	24 a 72 h	1 ou 2 inseminações, 2 e 4 pós-ovulação. ( $P_4$ entre 4 e 10ng/mL).	80 a 90% (deposição transcervical ou fundo de vagina)
Congelado	$50$ a $300 \times 10^6$ sptz/mL (diluído).	12 a 24 h	2 vezes ( $P_4 = 8$ ng/mL) e citologia vaginal de estro. Dias 5 a 7 pós-ovulação ( $P_4 = 18$ e $28$ ng/mL).	45% deposição vaginal, 67 -84% transcervical ou intra-uterina.

Fonte: Revisado e adaptado de Payan-Carreira (2011).

Inúmeros testes são necessários para se avaliar a qualidade do ejaculado canino; esses testes são classificados em convencionais ou avançados. As técnicas avançadas requerem metodologias e equipamentos mais sofisticados, enquanto as avaliações convencionais podem ser realizadas em laboratórios mais simples. A análise convencional inclui as avaliações macroscópicas de sêmen – volume e cor e a avaliação microscópica consta das análises de motilidade, concentração e morfologia espermática.

As variações nos resultados dos testes convencionais de sêmen podem atingir 30 a 60%, dependendo do laboratório e de diferentes profissionais (Coetzee et al., 2006); testes mais avançados não são usados como rotina devido aos custos, o que não permite, portanto, uma comparação segura dos resultados obtidos entre os laboratórios de pesquisa e maximiza a ocorrência de erros. Uma avaliação avançada é essencial quando se pretende preservar, particularmente congelar, amostras de sêmen. Os resultados obtidos com as avaliações mais sofisticadas de uma amostra de sêmen correlacionam-se mais com as taxas de IA do que com as avaliações tradicionais.

Embora a criopreservação das células espermáticas tenha sido usada por décadas, até o momento não está completamente esclarecido como as alterações que ocorrem como consequências da criopreservação contribuem para as falhas no processo de fertilização e/ou perda embrionária ou fetal. Essa questão é multifatorial, além do envolvimento de fatores espécie-específicos.

Durante o processo de congelação, muitos fatores influenciam a qualidade e a viabilidade do sêmen, incluindo a técnica de colheita de sêmen, o meio diluente, o processamento do sêmen, a concentração final de espermatozoides, a combinação do meio diluente, as curvas de congelação e o método de descongelação (Rijsselaere et al., 2002). Além disso, outro fator importante é a variação individual observada entre os cães e entre os ejaculados de um mesmo animal, tornando-os mais ou menos resistentes aos procedimentos de congelação (Pena et al., 2003).

Apesar de a motilidade ser parte importante para o transporte espermático no trato reprodutivo feminino, atualmente é considerada controversa a visão clássica, a qual considera o ejaculado como uma única população espermática, homogênea, com uma distribuição estatística normal, e com o uso de médias para classificação ou para acessar o efeito de tratamentos ou de um processo biotecnológico (Mortimer, 2000; Quinteiro-Moreno et al., 2003). Já é conhecido que o sêmen de diferentes espécies apresenta distintas



subpopulações, as quais são identificadas por meio de programas estatísticos e dos valores obtidos após a análise computadorizada (CASA) com base nessa teoria, a presença de uma subpopulação de velocidade mais rápida foi relacionada a cães de melhor potencial de congelabilidade em estudo realizado por Nunez-Martinez et al. (2006).

Tabela 2. Descrição resumida dos principais métodos avançados utilizados na avaliação da qualidade espermática.

Teste	Objetivo	Procedimento	Referências
Teste hiposmótico	Integridade de membrana (teste indireto)	Solução hiposmótica por 30 minutos a 37°C. Membrana intacta = edema e cauda enrolada.	Kumi-Diaka, 1993
Análise computadorizada de sêmen (CASA)	Avaliação da motilidade espermática	Caracterização da cinética dos sptzs. Permite a identificação de subpopulações espermáticas	Rijsselaere et al., 2003 Nizański et al., 2009
Teste de ligação em zona pelúcida	Avaliação do potencial fertilizante dos sptzs.	ZBA – oócitos homólogos HZA – hemizona microscópio de contraste de fase.	Rijsselaere et al., 2005 Strom-Holst et al., 2001.
Sondas fluorescentes e citometria de fluxo	Integridade de membrana e avaliação de vivos e mortos	Uso combinado de sondas: iodeto de propídio (PI) e acetato de carboxifluoresceína SYBR-14 + PI sptz íntegro – verde sptz lesado – vermelho	Rijsselaere et al., 2005 Silva e Gadella, 2006
	Reação de capacitação	Clortetraciclina fluorescente +Hoechst 33258 – avaliação da % de células vivas e reação de capacitação	Ptrunkina et al., 2004
	Reação do acrossoma	Lecitinas conjugadas: (FITC-PNA) ou (FITC-PSA). Ausência de fluorescência = acrossoma intacto, presença de fluorescência = reação de acrossoma.	Silva e Gadella, 2006
	Mitocôndria	Rodhamina 123 – sonda seletiva para mitocôndria funcional.	Gravance et al., 2001
	Integridade do DNA	Acridine Orange (OA) Verde: DNA intacto Vermelho: DNA desnaturado. TUNEL	Choran et al., 2006

Fonte: Adaptado de Payan-Carreira (2011).

Modificações subletais ocorrem nos espermatozoides como resultado da exposição a temperaturas e osmolaridade extremas, efeitos associados com a criopreservação. A criopreservação provoca um insulto osmótico importante que pode ser minimizado, mas não totalmente eliminado, pelo uso de agentes conservativos. Além disso, há evidências de que a criopreservação resulte em alterações do DNA, aneuploidia e fragmentação cromossômica.

Estresse oxidativo induzido pela geração de espécie reativa de oxigênio (ROS) *in vitro* resulta em redução da motilidade, viabilidade, reação do acrossoma e fusão oócito/espermatozoide. O peróxido de



hidrogênio parece ser a ROS primária responsável por essas mudanças, e acredita-se que peroxidação lipídica constitui o mecanismo de ação mais importante. A cascata da peroxidação lipídica inicia-se quando a ROS ataca os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) na membrana dos espermatozoides, a qual contém altas concentrações de PUFA e limitado poder de reparo. Como consequência ocorre perda da fluidez e da integridade da membrana espermática, que é necessária para os eventos associados com a fertilização.

Com o início do processo de congelamento, que corresponde a uma fase de super-resfriamento, a temperatura diminui para -5 a -15°C. Essa fase se inicia com a formação de cristais de gelo na solução extracelular, enquanto os componentes intracelulares permanecem descongelados (Hammerstedt et al., 1990). Com a contínua diminuição da temperatura, a célula é então exposta a uma condição hipertônica, desde que a água extracelular já se encontre congelada, e existe uma alta concentração de sal extracelular, causando ainda mais o efluxo de água de dentro da célula. O efluxo de água para fora da célula diminui a possibilidade de formação de cristais de gelo intracelular. Com uma congelamento lento, a célula fica exposta por mais tempo à condição hiperosmótica, levando a danos irreparáveis. Essa condição hiperosmótica é também chamada de efeito soluto (Holt, 2000).

Após a descongelamento, a osmolaridade da solução e o tamanho celular retornam ao normal (Hammerstedt et al., 1990). Os crioprotetores penetrantes possuem uma taxa de difusão, através da membrana, menor que a água, e quando as células são diluídas num fluido livre de crioprotetor ou no fluido do trato reprodutivo da fêmea, forma-se um gradiente osmótico entre o interior da célula e o meio externo, induzindo a um aumento de volume celular. A extensão e a duração desse aumento de volume celular são dependentes da quantidade e da taxa de difusão desses crioprotetores (Hammerstedt et al., 1990; Amann, 1999).

Como a criopreservação induz à perda da viabilidade e a um comprometimento da funcionalidade espermática após a descongelamento, reduzindo a habilidade fertilizante, a seleção de espermatozoides viáveis de um meio onde a maioria foi danificada ou morta deve ser um dos pré-requisitos para se alcançarem melhores resultados de concepção após a inseminação artificial com sêmen congelado/descongelado (Watson, 2000). Deste modo, a técnica de centrifugação por densidade de gradiente PureSperm<sup>®</sup> foi desenvolvida para selecionar espermatozoides viáveis e morfológicamente intactos no sêmen humano (Mousset-Simeon et al., 2004). Essa solução foi utilizada em cães (Dourado et al., 2011), com o intuito de separar o espermatozoide do plasma seminal e do meio diluidor e também de aumentar a quantidade de células morfológicamente normais para uso em biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial.

A demanda para a IA nos cães é crescente no mundo todo, bem como para um aumento significativo na utilização de sêmen preservação. Existe uma tendência para se aumentar o uso de sêmen congelado/descongelado em detrimento do sêmen fresco como parte das ferramentas para um incremento genético. Atualmente é possível se combinarem taxas adequadas de nascimento e tamanho de ninhadas a despeito do tipo de sêmen utilizado, principalmente quando a IA é realizada no momento mais propício do ciclo estral e a deposição do sêmen realizada em local apropriado. Um aconselhamento técnico adequado aos clientes deve acompanhar os serviços de IA que sempre devem ser realizados por profissionais especializados, sobretudo em se tratando de uma fêmea problemática.

## Referências

- Amann RP.** Cryopreservation of sperm. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). Encyclopedia of reproduction. Burlington: Academic Press, 1999. p.773-783.
- Andersen K.** Fertility of frozen dog semen. Acta Vet Scand, v.13, p.128-130, 1972.
- Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ, Shaughnessy D, Oehninger S, Ozgür K, Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT.** Chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. J Androl, v.27, p.53-59, 2006.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT.** Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. J Androl, v.27, p.53-59, 2006.
- Dourado J, Alcaraz L, Duarte N, Portero JM, Acha D, Hidalgo M.** Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm<sup>®</sup> gradient. Anim Reprod Sci, v.125, p.211-218, 2011.
- England GC, Millar KM.** The ethics and role of AI with fresh and frozen semen in dogs. Reprod Domest Anim, v.43, suppl.2, p.165-71, 2008.
- Foote RH.** The history of artificial insemination: Selected notes and notables. J Anim Sci, v.80, E suppl., p.22-32, 2002.
- Gravance CG, Garner DL, Miller MG, Berger T.** Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. Reprod Toxicol, v.15, p.5-10, 2001.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J Androl, v.11, p.73-88, 1990.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. Anim Reprod Sci, v.62, p.3-22, 2000.
- Kim HJ, Oh HJ, Jang G, Kim MK.** Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-



- thawed canine semen. *J Vet Sci*, v.8, p.75-80, 2007.
- Kumi-Diaka J.** Subjecting canine semen to the hypo-osmotic swelling test. *Theriogenology*. v.39, p.1279-1289, 1993.
- Linde Forsberg C.** Artificial Insemination. In: SAVS-EVSSAR Course Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animal, 2005, Nantes. Disponível em: [http://www.esavs.net/course\\_notes/reproduction1\\_05/artificial\\_insemination.pdf](http://www.esavs.net/course_notes/reproduction1_05/artificial_insemination.pdf).
- Linde-Forsberg C, Strom-Holst B, Govette G.** Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*, v.52, p.11-23, 1999.
- Linde-Forsberg C.** What can be learned from 2500 AIs in the dog? In: 27th World Congress of WSAVA, 2002, Granada, Spain. Proceedings... <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2685>.
- Mortimer ST.** CASA: practical aspects. *J Androl*, v.21, p.514-524, 2000.
- Mousset-Simeon N, Rives N, Masse L, Chevallier F, Mace B.** Comparison of six gradient media for selection of cryopreserved donor spermatozoa. *J Androl*, v.25, p. 881-884, 2004.
- Niżański W, Klimowicz M, Partyka A, Savić M, Dubiel A.** Effects of the inclusion of Equex STM into Tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5 degrees C. *Reprod Domest Anim*, v.44, suppl.2, p.363-365, 2009.
- Nöthling JO, Volkmann DH.** Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. *J S Afr Vet Assoc*, v.66, p.49-55, 1995.
- Nuñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ.** A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.408-415, 2006.
- Payan-Carreira R, Miranda S, Nizanski W.** Artificial insemination in dogs. In: Manafi M (Ed.). *Artificial insemination in farm animals*. 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-in-dogs>.
- Pena AI, Lopez-Lugilde L, Barrio M, Becera JJ, Quintela LA, Herradon PG.** Studies on the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of frozen-thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.27-35, 2003.
- Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E.** Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct? *Theriogenology*, v.61, p.1617-1634, 2004.
- Quintero-Moreno, A.; Miro, J.; Rigau, T.; Rodriguez-Gil, J.E.** Identification of sperm subpopulation with specific characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. v.59, p.1973-1990, 2003.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A.** Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*, v.57, p.1669-1681, 2002.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A.** Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*. v.60, p.1553-1568, 2003.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A.** New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*. v.64, p.706-719, 2005.
- Rota A, Iguer-Ouida M, Verstegen J, Linde-Forsberg C.** Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, v.51, p.1045-1058, 1999.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Rev Port Ciênc Vet*, v.98, p.53-60, 2003.
- Silva LDM, Onclin K, Snaps F, Verstegen J.** Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology*, v.43, p.615-623, 1995.
- Silva LDM, Verstegen JP.** Comparison between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v.44, p.571-579, 1995.
- Silva PF, Gadella BM.** Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.
- Stornelli MA, Stornelli, MC, Arauz, MS, de la Sota R.** Inseminación artificial com semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *Anal Vet*, v.21, p.58-66, 2001.
- 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. **Ström-Holst B, Larsson B, Rodriguez-Martinez H, Lagerstedt A-S, Linde-Forsberg C.** Zona pellucida binding assay a method for evaluation of canine spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, n.57, p.137-140, 2001
- Tsutsui T, Hase M, Tanaka A, Fujimura N, Hori T, Kawakami E.** Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of Orvus ES Paste-Supplemented egg yolk Tris-fructose citrate. *Jap Vet Med Sci*, v.62, p.603-606, 2000.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.481-492, 2000.
-