

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

JOSÉ LEONARDO GUALBERTO RAMOS

**UTILIZAÇÃO DO SÊMEN CANINO CONTAMINDADO COM URINA
APÓS PROCESSO DE DESCONTAMINAÇÃO**

Campos dos Goytacazes

2018

JOSÉ LEONARDO GUALBERTO RAMOS

Utilização do sêmen canino contaminado com urina após processo de descontaminação

**Tese de Doutorado apresentada ao
Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias, Laboratório de
Reprodução e Melhoramento Genético
Animal da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro.**

Orientadora: Prof.^a Isabel Candia Nunes da Cunha

Campos dos Goytacazes

2018

JOSÉ LEONARDO GUALBERTO RAMOS

**UTILIZAÇÃO DO SÊMEN CANINO CONTAMINDADO COM URINA
APÓS PROCESSO DE DESCONTAMINAÇÃO**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

Aprovada em 15 de março de 2018

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Eduardo Shimoda (D. Sc., Ciência Animal) - UCAM

Prof.^a Celia Raquel Quirino (D. Sc. Ciência Animal) - UENF

Prof. José Frederico Straggiotti Silva (D. Sc. Medicina Veterinária) - UENF

Prof.^a Isabel Candia Nunes da Cunha (D. Sc., Medicina Veterinária) – UENF (Orientadora)

DEDICATÓRIA

**Aos meus filhos queridos, Gabriel e Maria Fernanda.
A minha querida esposa, Cristina, por toda a dedicação.
Vocês são a razão do meu viver.**

À minha família e à orientadora Isabel, pelo incentivo e atenção.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), ao Centro de Ciências e tecnologias Agropecuárias (CCTA), ao Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), por oferecerem condições para a realização desta pesquisa;

A Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Campus Alegre e o Departamento de Medicina Veterinária pelo apoio e cooperação importantes para o desenvolvimento e realização da pesquisa.

À professora Isabel Candia Nunes da Cunha, pela orientação, compreensão e condição de trabalho.

A toda a equipe do Hospital Veterinário de Alegre.

Ao Aluno de Medicina Veterinária da UFES, Gabriel Uzai pela ajuda, amizade e companheirismo.

A Jovana Ferraz Cerqueira Campos, secretária da Pós-graduação Animal, pela amizade e atenção.

Ao professor e amigo Eduardo Shimoda, pela colaboração, dedicação, ensinamento e amizade.

Aos colegas de trabalho Márcia Faes, Natália Torres e Vinicius Maretto do Núcleo de Apoio à Reprodução de Carnívoros (NuARC), por terem me proporcionado um agradável convívio, me ajudando a tornar esta minha caminhada mais fácil.

A minha esposa, Cristina Leite Francisco Gualberto Ramos, que além de contribuir efetivamente na concretização deste trabalho, esteve o tempo todo ao meu lado com muita paciência, tornando meus dias menos pesados.

Aos meus filhos, Gabriel Leite Francisco Gualberto Ramos e Maria Fernanda Leite Francisco Gualberto Ramos, razão de tudo na minha vida.

Ao meu pai, José Eloi Ferreira Ramos que deu as condições de chegar aonde eu nunca poderia imaginar.

A minhas irmãs Gizela Gualberto Ramos e Tatiana Gualberto Ramos, por serem tão importantes na minha vida.

Aos meus primos Felipe Gualberto Freitas, Rafael Gualberto Freitas e Gustavo Gualberto Freitas que sempre me ajudam no momento de dificuldade.

As minhas cunhadas Cristiane Leite Francisco Baptista, Idália Maria D'Araujo Crischigno e Adriana Crischigno pelo incentivo e amizade;

A meu Cunhado Joel Martins que mesmo de longe sempre transmitiu incentivo e força nesta caminhada;

Ao meu concunhado Antônio Marcos Baptista pela ajuda, incentivo, companheirismo e amizade.

Ao meu concunhado Leonardo Hauaji pelo incentivo e amizade;

Aos meus sobrinhos emprestados Ana Luiza Hauaji, Leonardo Hauaji Filho, Bernardo Hauaji e Maria Eduarda Baptista pela amizade e incentivo.

Aos tios Rozana de Fátima Coutinho Gualberto de Freitas e Nilo José de Freitas pelo incentivo, amizade, ajuda e ótimo convívio que sempre me fizeram e faz feliz.

A Ettore (*in memoriam*) e Teresinha D' Araújo Crischigno pela credibilidade e incentivo;

Aos tios e tias pelos incentivos;

Ao Pré-vest UENF e amigos que lá o fiz e onde foi o início de tudo.

A todas as pessoas que, de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho;

A banca examinadora pelas considerações e conselhos para o aprimoramento do trabalho;

À minha querida mãe Rozenita Coutinho Gualberto Ramos (*in memoriam*) pelo carinho, incentivo e amor que foi, é e será a propulsão que me conduz a ir mais longe o quanto possível e que está feliz e nos guardando para seguir em frente;

A Deus.

.

Obrigado a todos.

“Uma mágoa não é motivo para outra mágoa. Uma lágrima não é motivo para outra lágrima. Uma dor não é motivo para outra dor. Só o riso, o amor e o prazer merecem revanche. O resto, mais que perda de tempo... é perda de vida.”

Chico Xavier

BIOGRAFIA

JOSÉ LEONARDO GUALBERTO RAMOS, filho de José Eloi Ferreira Ramos e Rozenita Coutinho Gualberto Ramos, nascido em 11 de abril de 1979, na cidade de Campos dos Goytacazes - RJ.

Iniciou o Curso de Medicina Veterinária em março de 1998, graduando-se em dezembro de 2002 na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes - RJ.

De janeiro de 2003 a dezembro de 2009 trabalhou como médico veterinário em clínica veterinária e foi responsável técnico de estabelecimentos comerciais destinados ao mercado Pet, neste período também participou de projetos de extensão na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), no Núcleo de Apoio a Reprodução de Carnívoros (NuARC).

Foi admitido em março de 2010 no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, na Universidade Federal do Espírito Santo – Campus Alegre, submetendo-se à defesa de dissertação para conclusão do curso em agosto de 2012.

No ano de 2016 foi admitido no curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Educação Ambiental, nível de Especialista, no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense (Campus Centro) submetendo-se a defesa de dissertação para conclusão do curso em agosto de 2017.

Em março de 2014 foi admitido no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, nível de Doutorado, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro em Campos dos Goytacazes-RJ, submetendo-se à defesa de tese para conclusão do curso em 15 de março de 2018.

RESUMO

Ramos, JLGR. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, março de 2018. Taxa de fertilização do sêmen canino contaminado com urina após processo de descontaminação. Professora orientadora: Isabel Candia Nunes da Cunha.

O avanço das biotecnologias de reprodução assistida tem despertado grande interesse da comunidade científica no que concerne à preservação de espécies carnívoras ameaçadas de extinção. Desde então, o desenvolvimento de biotecnologias utilizando animais domésticos filogeneticamente próximos, como modelo experimental, tem ganhado destaque. O cão doméstico vem desempenhando importante papel, permitindo a pesquisa, o aprimoramento e a aplicabilidade dessas tecnologias às espécies silvestres ameaçadas. Neste trabalho objetivou-se estudar os efeitos que a urina promove sobre o ejaculado e possibilitar, após uma metodologia de descontaminação, o aproveitamento deste ejaculado na reprodução. O trabalho foi didaticamente e cronologicamente dividido da seguinte forma: Primeiramente realizado um estudo bibliométrico sobre o tema “sêmen de cão” no período de 2005 a 2014, com objetivo de apresentar os principais indicadores bibliométricos e assim determinar a importância do tema a ser estudado, sendo observado a relevância do tema no Mundo e no Brasil demonstrado pelo interesse nas publicações e crescimento anual nas taxas de publicações sobre o tema; em um segundo momento foi avaliado o efeito da urina sobre espermatozoide em diferentes tempos (0, 15, 30, 45 e 60 min) e sob diferentes temperaturas de armazenamento (37°C e 5°C) com objetivo de obter parâmetros para promover possíveis protocolos de descontaminação, observou-se neste estudo que o tempo máximo entre a coleta e a descontaminação de uma amostra de sêmen contaminada com urina não deve ultrapassar os 30 minutos, e ainda, que a amostra contaminada deve ser mantida resfriada até o momento da descontaminação; em um terceiro momento foi submetido amostras contaminadas com urina a processo de descontaminação associando temperatura (37°C x 5°C) – filtragem (Sperm Filter®) x centrifugação) – diluidor (Formulado x comercial - Botu Turbo®) onde observamos que a centrifugação e filtragem são similares e a associação entre o diluidor comercial (Botu-Turbo®) e a manutenção das amostras resfriadas (5°C) proporcionam melhores resultados quanto à obtenção de células espermáticas de melhor qualidade; em um último trabalho (relato de caso) foi avaliado a aplicabilidade da técnica de descontaminação que associava a manutenção da amostra refrigerada (5°C) com uso da

filtragem com Sperm Filter® e ressuspensão do material em diluidor comercial (Botu-Turbo®) em ejaculado de um cão urospérmico, sendo utilizado esse sêmen após descontaminação em protocolo de IA de duas cadelas de raça Pug. Como resultado verificamos que o processo de descontaminação possibilitou a obtenção de células espermáticas viáveis que promoveram a fertilização e por consequência gestação das cadelas.

Palavras chave: sêmen de cães, contaminação sêmen, descontaminação sêmen, reprodução.

ABSTRACT

Ramos, JLGR. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February, 2018. Fertilization rate of canine semen contaminated with urine after decontamination. Teacher: Isabel Candia Nunes da Cunha.

The advancement of assisted reproduction biotechnologies has aroused great interest from the scientific community regarding the preservation of carnivorous species threatened with extinction. Since then, the development of biotechnologies using phylogenetically close domestic animals, as an experimental model, has gained prominence. The domestic dog has played an important role, allowing the research, the improvement and the applicability of these technologies to the threatened wild species. The objective of this study was to study the effects that urine promotes on ejaculate and to enable, after a decontamination methodology, the use of this ejaculate in reproduction. The paper was divided into the following sections: Firstly, a bibliometric study was carried out on the theme "dog semen" from 2005 to 2014, in order to present the main bibliometric indicators and thus determine the importance of the subject to be studied, being observed the relevance of the theme in the World and in Brazil demonstrated by the interest in the publications and annual growth in the rates of publications on the subject; the effect of urine on spermatozoa at different times (0, 15, 30, 45 and 60 min) and under different storage temperatures (37 ° C and 5 ° C) was evaluated in order to obtain parameters to promote possible decontamination protocols, it was observed in this study that the maximum time between collection and decontamination of a sample of semen contaminated with urine should not exceed 30 minutes, and also that the contaminated sample should be kept cooled until the time of decontamination ; in a third moment, samples contaminated with urine were submitted to a decontamination process associating temperature (37 ° C x 5 ° C) - filtration (Sperm Filter®) - centrifugation) - diluent (Formulated x commercial - Botu Turbo®) where we observed that the centrifugation and filtration are similar and the association between the commercial diluent (Botu-Turbo®) and the maintenance of the cooled samples (5°C) provide better results in obtaining better quality sperm cells; in a last work (case report) the applicability of the decontamination technique associated with the maintenance of the refrigerated sample (5 ° C) with the use of Sperm Filter® filtering and resuspension of commercial thinner material (Botu-Turbo®) in ejaculate of a urospermic dog, and this semen was used after decontamination in AI protocol of two

Pug bitches. As a result, we verified that the decontamination process allowed to obtain viable sperm cells that promoted the fertilization and consequently gestation of bitches.

Keywords: semen of dogs, semen contamination, semen decontamination, reproduction.

ÍNDICE

RESUMO	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
2 . JUSTIFICATIVA	15
3 – HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	17
4. OBJETIVOS.....	17
5- REVISÃO DE LITERATURA	18
5.1 Coleta e análise do sêmen.....	18
5.2 Contaminação do sêmen com urina.....	20
5.3 Mecanismos para evitar efeitos deletérios da urina sobre os espermatozoides.....	21
5.4 - Processamento sêmen.....	21
6 – REFERÊNCIAS	22
7. TRABALHOS	29
TRABALHO 1	30
Indicadores bibliométricos das publicações na base scopus a respeito do tema “sêmen de cães”.....	30
TRABALHO 2	45
Avaliação sêmen canino contaminado com urina em meios refrigerado e aquecido.....	45
TRABALHO 3	57
Avaliação de dois métodos de descontaminação sêmen canino contaminado com urina: Centrifugação e Filtragem	57
TRABALHO 4	70
Inseminação artificial com sêmen de cão urospérmico após descontaminação	70
7 – CONCLUSÕES GERAIS	81

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, as pesquisas na área de biotecnologia da reprodução se restringiram à estudos com animais de produção e somente a partir da década de 90, com o interesse na preservação da biodiversidade é que a espécie canina mereceu maior atenção, aspecto este proporcionado pelo fato da espécie canina constituir-se modelo experimental para canídeos ameaçados de extinção, dentre eles o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), cachorro-do-mato vinagre (*Spheothos venaticus*), e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), espécies da fauna brasileira.

As biotécnicas reprodutivas mais utilizadas na reprodução assistida em cães são a inseminação artificial (MAKLOSKI, 2012) e a preservação do sêmen (MADEIRA *et al.*, 2010). Esta última tem sido realizada de duas maneiras: por meio do resfriamento (WITTAYARAT *et al.*, 2012), que objetiva a utilização do sêmen a curto prazo, e da congelamento (FUTINO *et al.*, 2010), que mantém o sêmen viável por tempo indeterminado.

A utilização da inseminação artificial (IA) na espécie canina tem sido bastante utilizada na atualidade, contudo são necessários maiores conhecimentos e controle dos fatores que podem influenciar seu sucesso. Assim, diversos estudos são conduzidos visando encontrar metodologias de preservação de gametas que permitam uma perda mínima da qualidade do sêmen, maior eficácia na determinação do momento ideal para a inseminação e utilização de uma via eficiente e de menor risco ao animal (CHIRÍNEA, *et al.*, 2006, THOMASSEN E FARSTAD, 2009, HORI, *et al.* 2011 e HAYASHI *et al.* 2013).

Cada espécie tem sua particularidade quanto à obtenção e congelamento de gametas. Nos canídeos é relatada a contaminação por urina, seja pela emissão de urina junto com o sêmen (urospermia), ou pela ejaculação em direção a bexiga (ejaculação retrógrada), que pode ocorrer tanto na monta natural, na coleta por estimulação peniana ou durante a eletro-ejaculação (CAZES, 2006 e SANTOS *et al.* 2011).

Quando os espermatozóides são submetidos a um ambiente contaminado por urina, a primeira alteração a ser percebida é a redução na motilidade (MAKLER *et al.*, 1981; GRIGGERS *et al.*, 2001, SANTOS, *et al.* 2011).

As técnicas para contornar os efeitos deletérios da urina sobre o espermatozóide podem ser pré ou pós-ejaculatórias. Em técnicas pós-ejaculatórias usa-se a

centrifugação do sêmen contaminado por urina (GRIGGERS *et al.*, 2001; NICOLAS *et al.*, 2011, SANTOS, 2011), diluidores que reduzem as perdas da viabilidade espermática, como o meio Cheng em humanos, que contém NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃ e glicose (TSAI *et al.*, 1990), ou pelo uso de diluidor à base de leite, em equinos (GRIGGERS *et al.*, 2001). Santos *et al.*, (2005) sugerem que a diluição e a lavagem com o diluidor Kenney das amostras contaminadas de cães podem ajudar a restaurar a motilidade progressiva dos espermatozóides.

Estudos com sêmen canino contaminado com soluções de ringer simples com concentrações $\leq 25\%$ de urina e resfriado com o diluidor Kenney demonstraram que os espermatozóides permanecem viáveis por pelo menos 24h após contaminação e lavagem (SANTOS *et al.* 2011).

A associação da criopreservação e a IA por via intrauterina (IAIU) fica reservada para casos particulares, onde a via vaginal poderia comprometer os resultados da IA, como, por exemplo, na utilização de uma amostra de sêmen congelado com baixa qualidade pós-descongelamento (SILVA, 1995, GOMES-ALVES *et al.* 2014). Segundo Johnston *et al.* (2001), a IAIU pode ainda ser utilizada como uma alternativa para melhorar as taxas de fertilidade de machos oligospermicos, ou seja, com um baixo número de espermatozóides no ejaculado, além de casos de sêmen oriundo de eletroejaculação para congelamento e que sofrem contaminação por urina (SANTOS *et al.*, 2011).

No trabalho com animais em via de extinção, toda amostra de sêmen colhida deve ser aproveitada bem como devemos priorizar o uso de técnicas minimamente invasivas para rápida execução e sucesso reprodutivo.

2 . JUSTIFICATIVA

O conhecimento produzido pelas pesquisas tem que ser transformado em informação acessível para a comunidade científica e geral. Portanto esta é desenvolvida em um contexto de troca. A publicação dos resultados de pesquisa tem três objetivos: divulgar descobertas científicas, salvaguardar a propriedade intelectual e alcançar a fama (SANTOS; KOBASHI, 2009, p.1, MESQUITA *et al.*, 2006, p. 18).

A publicação é para a maioria daqueles que atuam na pesquisa, não só um indicador, mas o produto final de todo um esforço criativo. Dessa forma, qualquer contribuição só é reconhecida após ser publicada, julgada e incorporada, de alguma maneira, aos conhecimentos já existentes. O ciclo do conhecimento só se completa após a aceitação da descoberta por outros cientistas da mesma área e isso se dá pela publicação.

Os estudos para obtenção e conservação de gametas têm sido utilizados para reproduzir artificialmente animais de produção, companhia e selvagens. Assim, diversos estudos são conduzidos visando encontrar metodologias de preservação de gametas que permitam uma perda mínima da qualidade do sêmen, maior eficácia na determinação do momento ideal para a inseminação e utilização de uma via de inseminação eficiente e de menor risco ao animal (HORI *et al.*, 2011; HAYASHI *et al.*, 2013; ROMAGNOLI, S. e LOPATE, 2014).

A contaminação do sêmen com urina reduz a fertilidade espermática, comprometendo assim a fertilização. Esta contaminação ocorre naturalmente em canídeos por retroejaculação e ejaculação acompanhada de micção (ROMAGNOLI, 1999; WATSON E HOLT, 2001; SILVA *et al.*, 2004), ou durante o procedimento de eletroejaculação (NEWELL-FUGATE, 2009).

Na maioria dos trabalhos os protocolos utilizados para evitar os efeitos da contaminação do sêmen com urina durante as coletas incluem: lavagem do sêmen em meio diluidor por meio da centrifugação logo após a coleta (MAKLER *et al.*, 1981; GRIGGERS *et al.*, 2001), uso de simpatomiméticos agonistas- α_2 para fechar o colo da bexiga no momento da ejaculação (ROMAGNOLI, 1999) e introdução de uma quantidade de tampão dentro da bexiga suficiente para neutralizar o efeito deletério da urina sobre o sêmen (BRASSESCO *et al.*, 1988; RANIERI *et al.*, 1995) porém com considerável variação nos resultados.

Deste modo, identificar o interesse e importância sobre o estudo do tema “sêmen de cães” faz-se necessário para promover um maior conhecimento sobre o assunto, e assim alicerçar a execução de trabalhos, como o de em situações (eletroejaculação) em que o momento, local, tempo e amostras não são ideais (contaminado por urina). Da mesma forma, é importante e necessário o estudo e desenvolvimento de metodologias que possibilitem entender a ação deletéria em caso de contaminação e técnicas que possam ser utilizadas na descontaminação e que garantam o mínimo de qualidade e viabilidade espermática.

3 – HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- O estudo sobre sêmen de cães possui relevância e importância para ser estudado por estar inserido como tema recorrente no ambiente de pesquisas.
- A ação deletéria da urina proporciona possibilidade de recuperação ou descontaminação de ejaculados até 15 minutos após contato direto.
- Uso da filtração (Sperm Filter®, Botupharma, Brasil) proporciona descontaminação e recuperação de células espermáticas comparado ao método de comum de preparação de amostra seminais (centrifugação 800g x 5 min).
- O resfriamento (5°C) da amostra ejaculado contaminada por urina proporciona melhores resultados pós-descontaminação que a manutenção da amostra aquecida (37°C)..

4. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o efeito da urina sobre ejaculado e o uso de dois métodos de descontaminação.

Objetivos específicos:

- 1- Apresentar a importância sobre estudo sobre sêmen de cães através de indicadores bibliométricos.
- 2- - Avaliar o tempo de deletério da urina sobre espermatozoide (0, 15, 30, 60 min)
- 3- Avaliar o efeito de métodos de descontaminação dos ejaculados: Centrifugação e filtração.
- 4- Avaliar o efeito de diluidores (formulado X Comercial) sobre ejaculados descontaminado.

5- REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Coleta e análise do sêmen

O ejaculado canino é naturalmente dividido em três frações distintas sendo a primeira chamada de uretal ou pré – espermática, a segunda de fração rica em espermatozoides e a terceira de fração prostática ou pós- espermática (EGLAND e ALLEN, 1992 e CUNHA, 2008)

Diversos métodos foram descritos para a coleta de sêmen nesta espécie, tais como: estímulo manual do pênis, uso de vagina artificial, vibrador elétrico e eletroejaculação (HARROP, 1955; CHRISTIANSEN, 2011, SANTOS, *et al.*, 2011). Embora eletroejaculação não seja o método padrão para coletar o sêmen de cães domésticos, este é o de escolha para uso associado com biotécnicas reprodutivas que têm sido desenvolvidos no cão para uso em canídeos em vias de extinção (MINTER e DELIBERTO 2005).

Segundo Silva *et al.* (2003) e Kutzler (2005), o estímulo manual do pênis permite a obtenção de uma amostra seminal de qualidade superior ao obtido por vagina artificial, sendo que o primeiro método é especialmente confiável mesmo para cães não condicionados e sem a necessidade da presença de uma fêmea em estro.

A análise padrão do sêmen inclui observação macroscópica (volume, coloração, pH e osmolaridade) e microscópica (concentração, morfologia espermática, motilidade e vigor (JOHNSTON *et al.*, 2001 e CBRA, 2013).

A motilidade espermática consiste na determinação da porcentagem de espermatozoides móveis na amostra avaliada imediatamente após a coleta ou após a descongelamento do sêmen em microscópio com aumento de 100 a 400 x (SEAGER e FLETCHER, 1972; CBRA, 2013). O estudo da motilidade após a criopreservação tem como objetivo verificar a proporção de espermatozoides que mantiveram a motilidade após possíveis injúrias causadas pelo processo (PEÑA, 2000,).

O vigor espermático define-se como a qualidade do movimento exibido pelos espermatozoides móveis (JOHNSTON *et al.*, 2001).

A morfologia espermática é um importante parâmetro ligado a problemas de fertilidade. Dentre os métodos desenvolvidos para avaliar a morfologia da célula espermática, podemos confeccionar esfregaços úmidos de sêmen que devem ser

examinados por microscopia de contraste de fase após a fixação com glutaraldeído ou tampão salina formolizado a fim de manter as características celulares para futura observação. Outros métodos incluem o uso de corantes Wright, Rosa de Bengala (STRÖM *et al.*, 1997), Giemsa (CARDOSO *et al.*, 2003), Hematoxilina-eosina (SILVA *et al.*, 2003a) e eosina-nigrosina (PEÑA, 2000). Existem dois principais métodos de classificação das alterações morfológicas. Um deles é dividido em alterações primárias e secundárias (JOHNSTON *et al.*, 2001), e o segundo em defeitos maiores e menores (OETTLÉ, 1993, CBRA 2013).

A morfologia do espermatozóide pode ser alterada pela manipulação do sêmen nos processos como a criopreservação (OÉTTLE, 1986) e as alterações de osmolaridade, influenciam no volume do espermatozóide, levando ao enrolamento da cauda quando o espermatozóide é colocado em uma solução hiposmótica (KUMIDIKA, 1993). O teste hipo-osmótico (HOS) torna-se então um simples e barato teste para avaliar a integridade funcional das membranas celulares do espermatozóides sendo de acordo com a literatura de simples aplicabilidade e repetibilidade e um parâmetro adicional e valioso na análise do sêmen canino (KARGER *et al.*, 2014). Ao realizar o teste HOS, os espermatozóides são expostos a soluções hipo-osmótico e sob estas condições, espermatozóides incham ao influxo de água até que o equilíbrio seja atingido, resultando na ondulação/dobra de suas caudas. Após a incubação amostras são examinadas entre lamínas e lamínulas sob um microscópio de contraste de fase e os espermatozóides com cauda dobradas são os que apresentam membranas integras (Organização Mundial de Saúde 2010, KARGER *et al.*, 2014).

Uma amostra de sêmen fresco de boa qualidade deve exibir motilidade mínima de 70% (JOHNSTON *et al.*, 2001, CBRA, 2013). O vigor espermático (qualidade da motilidade exibida pelos espermatozóides) deve ser no mínimo 3, observada em escala que varia de 0 a 5 (PLATZ e SEAGER, 1977, CBRA, 2013). Tabela 1.

Tabela 1 - Características do Sêmen de cão doméstico de acordo com o tipo (Fresco, Refrigerado e Congelado) para uso na inseminação artificial.

Característica	Fresco	Refrigerado	Congelado
Motilidade espermática	≥ 70 %	≥ 50 %	≥ 30 %
Vigor	≥ 3	≥ 3	≥ 3
Dose inseminante convencional (x 10 ⁶ /mL)	150 – 200	150	30 – 50
Espermatozoides morfológicamente normais	≥ 70 %	≥ 70%	≥ 70 %
	80 – 90 % deposição	80 a 90% deposição	45% deposição vaginal
Fertilidade	fundo da vagina e transcervical	transcervical ou fundo de vagina	67 - 84% transcervical ou intra-uterina

Fonte: Revisado e adaptado de CHIRINEA E LOPES 2013 e CBRA 2013

5.2 Contaminação do sêmen com urina

A contaminação com urina se dá devido à relação estreita entre o trato urinário com o sistema reprodutor e pode ser devido a mecanismos fisiológicos, patológicos ou pelo método de colheita de sêmen (SANTOS *et al.* 2007).

Em animais em via de extinção como canídeos, felídeos e ursídeos é observado tanto a micção como a ejaculação retrograda em processos de obtenção do sêmen pela eletro-ejaculação (ROMAGNOLI, 1999, CAZES, 2006 e GOMES-ALVES *et al.* 2014).

Os efeitos da urina sobre espermatozoides já foram descritos em experimentos *in vitro*, onde há um consenso da ação desta sobre redução da motilidade (GRIGGERS *et al.*, 2001 e SANTOS *et al.*, 2005), bem como, os principais efeitos induzidos pela urina ao espermatozoides que está relacionado com mudanças na osmolaridade, embora só soluções mais hiposmóticas causem alterações morfológicas (SANTOS *et al.*, 2011).

5.3 Mecanismos para evitar efeitos deletérios da urina sobre os espermatozoides

O conhecimento dos mecanismos que controlam a ejaculação e micção proporcionaram o uso de medicações como os alfa 2 – adrenérgicos e para levar ao fechamento do colo da bexiga e assim impedir a ejaculação retrógrada no homem (BRASSESCO, 1988) e em cães (ROMAGNOLI, 1999) e associações anestésicas, tais como tiletamina e zolazepam (CUNHA *et al.*, 2008), ou cetamina e xilazina (MINTER E DELIBERTO e 2005), ou cetamina, medetomidine e atropina (JOHNSTON *et al.*, 2007) ou halotano (OHL *et al.*, 1994), minimizam este efeito durante a eletroejaculação

Em casos de a ejaculação retrógrada ter ocorrido ou a micção junto com a ejaculação deve-se reduzir o efeito tóxico da urina com a diminuição do tempo de contato dos espermatozoides com esta, por meio da lavagem do sêmen, centrifugação e diluição do precipitado em soluções específicas como uso de diluidores base de leite para recuperar a motilidade como observado em equinos (GRIGGERS *et al.*, 2001) e em cães (Santos *et al.*, 2005) e lavagem em gradientes de osmolaridade de Tes-tris-Fructose de ejaculados contaminados com urina como realizado em ejaculados de ursos (GOMES-ALVES, 2014).

5.4 - Processamento sêmen

O sêmen fresco deve ser utilizado em um curto período após sua coleta. A IA com sêmen fresco oferece taxas de gestação similares às obtidas com a monta natural (PEREIRA *et al.*, 2001). É possível realizar a expansão da fração espermática destinada a IA, geralmente realizada adicionando-se o líquido prostático autólogo até ser atingido o volume desejado (SILVA *et al.*, 2002).

A conservação pelo frio é utilizada até hoje e vem sendo objeto de pesquisas, visando aprimorar as técnicas de refrigeração e congelamento do sêmen. O uso de inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado possui maior flexibilidade do que com sêmen a fresco (SILVA *et al.*, 2002), uma vez que, quando o sêmen é adequadamente diluído e refrigerado, os espermatozóides podem se manter vivos e viáveis por 24 – 48 horas e, dependendo do meio diluidor e condições de armazenamento por até cinco dias (CUNHA *et al.*, 2014).

Martins (2005) relata que os métodos de congelação têm sido baseados nas cinco etapas descritas por Hammerstedt *et al.*, (1990): 1) diluição e refrigeração; 2) adição do crioprotetor e envasamento; 3) congelação; 4) armazenamento e 5) descongelação.

A composição dos diluentes utilizados geralmente incluem: crioprotetores (glicerol, etilenoglicol e outros), nutrientes e tampões. Assim, durante o processo de criopreservação do sêmen canino é relatado o uso de diluentes tais como a lactose (SEAGER, 1969); o Triladyl (NOTHLING *et al.*, 1995), o Biociphos W482 e o Laiciphos 478 (SILVA e VERSTEGEN, 1995); o leite desnatado e a glicina-gema (CUNHA e LOPES, 1997), o Tris (UCHOA *et al.*, 2001), o Tris-gema (STORNELLI *et al.*, 2001), a água de coco (CARDOSO *et al.*, 2003), e o leite desnatado (YASUYUKI ABE *et al.*, 2008). A grande desvantagem dos diluentes comerciais é que sua exata composição não é divulgada.

Diversas publicações demonstram o tampão Tris como superior a outros diluidores, tanto para a refrigeração, quanto para a congelação, sendo este o diluidor mais utilizado pela maioria dos grupos de pesquisa da atualidade (FARSTAD, 1996; SILVA *et al.*, 2000), porém em estudos avaliando Tris a meio comercial (MP50) e Tris a diluidores a base de leite mostraram ser semelhantes pós descongelação quanto a características morfofuncionais (CHIRINÉA. *et al.*, 2006).

6 – REFERÊNCIAS

BRASSESCO, M., VISCASILLAS, P., BURREL, L., CALAF, J., RAJMIL, O., SERRA, J.M.P., FARGAS, F.M. Sperm recuperation and cervical insemination in retrograde ejaculation. *Fertility and Sterility*, v. 5, p.923-924, 1988.

CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R, UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, n. 59, p. 743-751, 2003.

CAZES, L. B. *Avaliação da eficiência de métodos de recuperação de gameta masculino em cão doméstico*. 2006. p. 82. **Dissertação** (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.

CBRA: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 49p

CHIRINEA, V.H.; SICHERLE, C.C., LOPES, M.D. Congelamento de sêmen e sua eficiência na inseminação artificial de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.37, n.2, p.164-168, 2013.

CHIRÍNEA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; TEBET, J.M.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D. características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes., v. 7, n. 4, p. 407-415, *Ciência Animal Brasileira* 2006.

CHRISTENSEN, B. W. et al. Effect of semen collection method on sperm motility of gray wolves (*Canis lupus*) and domestic dogs (*C. l. familiaris*), *Theriogenology*, v. 76, p. 975–980, 2011.

CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**. Editora Manole (São Paulo), 1988.

CONCANNON, P.W.; BATISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy*, v. 10, p. 1247-1259, 1989.

CUNHA, I.C.N. Exame andrológico do cão. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*. v. 1, n. 1, p. 49-65, 2008.

CUNHA, I.C.N., LOPES, M.D. Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluentes à base de leite e glicina gema. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n. 21, v. 2, 1997.

CUNHA, I.C.N., MORATO, R.G., SANTOS, I.P..Biometry of the reproductive system and the ejaculation response of maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) to electroejaculation procedure. In: **6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction**, Viena, pp. 68–69, 2008.

CUNHA, I.C.N.; HENNING, H.; URHAUSEN, C; BEYERBACH, M; GÜNZEL-APEL, A.R. A commercial box for dog semen transport: What happens inside when the environmental temperature is increasing? *Animal Reproduction Science*, v.147 (1-2), p.86-92, 2014.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para a avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. In: **CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**, 15, 1996, Campo Grande, 1996, 411p.

DOOLEY. M.P.; PINEDA, M.H.; HOPPER, J.G.; HSU, W.H. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of dogs during ejaculation or after sedation with xylazine. *American Journal of Veterinary Research*, v. 51, n. 10, p.1574- 1579, out. 1990.

ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II: Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, n.37, 373 – 381, 1992.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.251-260, 1996.

FUTINO, D.O., MENDES, M.C.B., MATOS, M.N.L., MONDADOR, R.G., LUCCI, C.M. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.214-220, 2010.

GOMES-ALVES, S., ALVAREZ, M., NICOLAS, M., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C., BORRAGÁN, S., CHAMORRO, C.A., ANEL, L., PAZ, P. Salvaging urospermic ejaculates from brown bear (*Ursus arctos*). **Animal Reproduction Science**. V. 150, p.148–157, 2014.

GRIGGERS, S.; PACCAMONTI, D.L.; THOMPSON, R.A.; EILTS, B.E. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 613-622, set. 2001.

HAMMERSTEDT, R., GRAHAM, J., NOLAN, J. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.73-88, 1990.

HARROP, A.E. Some observations on canine semen. **Veterinary Record**, 67, 494-498, 1955.

HAYASHI, K., MORITA, R., ASO, T., ONO, M., HOTAKI, T., TANEMURA, K., WATARI, T., TSUMAGARI, S. Evaluation of Transcervical Insemination using Frozen Semen by Flexible Endoscope in Dogs. **Journal of Veterinary and Medicine Science**. v.75(3), p. 315–318, 2013.

HORI, T. MATSUDA, Y. KOBAYASHI, M., KAWAKAMI, E., TSUTSUI, T. Comparison of Fertility on Intrauterine Insemination between Cryopreserved Ejaculated and Cauda Epididymal Sperm in Dogs. **Journal of Veterinary and Medicine Science**. v. 73(12), p.1685–1688, 2011.

JOHNSTON, S.D., WARD, D., LEMON, J., GUNN, I., MACCALLUMB, C.A., KEELEY, T., BLYDE, D. Studies of male reproduction in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). **Animal Reproduction Science**. V.100, p.338–355, 2007.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline theriogenology**. W.B.Saunders (Philadelphia), 2001.

KARGER, S., ARLT, S., HAIMERL, P., HEUWIESER, W. A Systematic Review of Studies Performing the Hypo-Osmotic Swelling Test to Evaluate the Quality of Canine Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**. V. 49, p. 1–6, 2014.

KUMI-DIAKA J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic swelling test. **Theriogenology**. v.39, p.1279-1289, 1993

KUTZLER, M. A. Semen collection in the dog. **Theriogenology** . V. 64: 747–754, 2005.

LOPES, G.; SIMÕES, A.; FERREIRA, P.; MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A. Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. **Animal Reproduction Science**, v. 112, n.1, p. 158-163, mai. 2009.

MACEDO, S.P., MALM, C., HENRY, N.R.J.M., TELLES, L.F., FIGUEIREDO, M.S., FUKUSHIMA, F.B., NEVES, M.M., CAVALCANTI, G.A., CHAVES, M.S., MASCARENHAS, R.M., GHELLER, V.A. Endoscopic transcervical intrauterine artificial insemination in Labrador Retriever bitches. **Reserch Veterinary Science**. V.92, p.494– 500, 2012.

MADEIRA, V.L.H., MONTEIRO, C.L.B., BARBOSA, C.C., JUCÁ, R.P., OLIVEIRA, A.C., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Efeito de diferentes protocolos de descongelação sobre o sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco em pó (ACP®). **Ciência Animal Brasileira**. v.11, p.845-852, 2010.

MAKLER, A.; DAVID, R.; BLUMENFELD, Z.; BETTER, O.S. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of urine specimens. **Fertility and Sterility**, v. 36, n. 4, p. 507-511, out. 1981.

MAKLOSKI, C. L. Clinical Techniques of Artificial Insemination in Dogs. **Vet Clin Small Anim**. 42 439–444, 2012.

MARTINS, M. I. M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005.

MESQUITA, R.; BRAMBILLA, S.; LAIPELT, R. C. F.; MAIA, F.; VANZ, S.; Caregnato, S. Elaboração e aplicação de instrumentos para avaliação da base de dados Scopus. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 11, p. 187 -205, 2006.

MINTER, L. J.; DELIBERTO, T. J. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on postthaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 1898-1912, 2005.

NEWELL-FUGATE, A.E. **The effects of two formulations of deslorelin on the reproduction of male African wild dogs (*Lycaon pictus*)**. p. 125. Dissertação, University of Pretoria, South Africa, 2009.

NICOLAS, M.; ALVAREZ, M.; GOMES-ALVES, S.; MATA-CAMPUZANO, M.; BORRAGÁN, S.; MARTINEZ-PASTOR, F.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Effects on Brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa freezability of different extender and dilution ratios used for pre-freezing centrifugation. **European Journal of Wildlife Research**, v. 57, n. 2, p. 259-266, 2011.

NÖTHLING, J.O., VOLKMANN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozenthawed dog semen: A retrospective study. **Journal Small African Veterinary Association**, v. 66, p.49-55, 1995.

OETTLÉ, E.E. Changes in acrossome morphology during cooling and freezing of dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.145-50, 1986.

OETTLE, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, 47, p. 257-260, 1993.

OHL, D.A.; DENIL, J.; CUMMINS, C.; MENGE, A.C.; SEAGER, S.W.J. Electroejaculation does not impair sperm motility in the beagle dog: a comparative study of electroejaculation and collection by artificial vaginal. **The Journal of Urology**, v. 152, n. 3, p. 1034-1037, set. 1994.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoal concentration and post thaw dilution rate and survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 703-718, 2000.

PEREIRA, B.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Comparação da monta natural e inseminação artificial com sêmen diluído em água de coco em cadelas da raça Boxer. **Ciência Animal**, v. 11, n. 2, p. 97-100, 2001.

PLATZ, C.C., SEAGER, S.W.J.. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Laboratory Animal Science**, 27, 1013 – 1016, 1977.

RANIERI, D.M., SIMONETTI, S., VICINO, M., CORMIO, L., SELVAGGI, L. Successful establishment of pregnancy by superovulation and intrauterine insemination with sperm recovered by a modified Hotchkiss procedure from patient with retrograde ejaculation. **Fertility and Sterility**, v.5, p.1039-1042, 1995

ROMAGNOLI, S. Retrograde ejaculation in the dog. **WSAVA CONGRESS**. 1999.

ROMAGNOLI, S.; LOPATE, C. Transcervical Artificial Insemination in Dogs and Cats: Review of the Technique and Practical Aspects. **Reproduction in Domestic Animals**, 49 (Suppl. 4), 56–63, 2014.

SANTOS, I.P. , CUNHA, I.C.N., MELO, E.J.T. Effects of urine and NaCl solutions of different osmolarities on canine sperm. **Anim. Reprod**, v.8, n.3/4, p.73-76, 2011.

SANTOS, I.P. **APERFEIÇOAMENTO DOS PROTOCOLOS DE COLETA E TECNOLOGIA DE SÊMEN DE CÃES (*Canis lupus familiaris*, LINNAEUS, 1758) SUBMETIDOS À ELETROEJACULAÇÃO**. Tese (Doutorado) – Universidade estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2011.

SANTOS, I.P., CUNHA, I.C.N., LOPES, B.V., ROCHA, A.A. Efeito da urina sobre o sêmen canino: resultados preliminares. **XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Goiânia, 2005

SANTOS, R. N. M. ; KOBASHI, N. Y. Bibliometria, cientometria, infometria: conceitos e aplicações. **Pesquisa Brasileira em Ciência da Informação**. v. 2, n.1, p.155-172, 2009.

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

SEAGER, S.W.J., FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Laboratory Animal Science**, 22, 177-182, 1972.

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. **Ciência Rural**, 6, 1021-1025, 2000.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Quality of canine sêmen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-829, 2003.

SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Uso da sonda de Osiris na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Rottweiler. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p. 147-149, 2003a.

SILVA, L.D.M. **Procréation medicalelement assistée dans l' espèce canine. Investigations morpho-fonctionnelles et optimisation dès techniques permettant d'arriver á la maetrise de la reproduction.** Tese (Doutorado) Université de Liège, 173p. 1995c.

SILVA, L.D.M.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S. Inseminação artificial em cães. Em: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Eds. P.B.D. Gonsalves, J.R.F. Figueiredo, V.J.F. Freitas. Varela, São Paulo. p. 69-95, 2002b.

SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, n. 44, p. 571-579, 1995.

STORNELLI, M.A., STORNELLI, M.C., ARAUZ, M.S., SAVIGNONE, C.A., GARCÍA, M., DE LA SOTA, R.L. Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado refrigerado a 4 °C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 468-470, 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.

THOMASSEN, R., FARSTAD, W. Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. **Theriogenology** . v.71, p.190–199, 2009.

TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, p. 269-275, 1989.

UCHOA, D.C., SILVA, A.R., SILVA, T.F.P., SILVA, L.D.M. Inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Bassethound utilizando a Sonda de Osiris®. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 371-373, 2001.

WATSON, P.F., HOLT, W.V. Cryobanking the Genetic Resource – Wildlife Conservation for the future. *Cryopreservation of Gametes and embryos of Canidae and Felidae*. London: Taylor & Francis. pp. 363, 2001

WAYNE, R.K.; VILA, C. Phylogeny and origin of the domestic dog. In: **The genetics of the dog**, Eds. A. Ruvinsky, J., Sampson, CAB International. p. 1-13, 2001.

WILSON, M.S. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, n. 47, p. 307- 311, 1993.

WITTAYARAT M, KIMURA T, KODAMA R, CHATDARONG K, TECHAKUMPHU M, SATO Y, TANIGUCHI M, OTOI T. Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin c in combination with green tea polyphenol. **Cryo Lett**, v.33, p.318-326, 2012

Yasuyuki ABE, Dong-Soo LEE, Hikaru SANO, Koji AKIYAMA, Yoshiko YANAGIMOTO-UETA, Tomoyoshi ASANO, Yoshinori SUWA, Hiroshi SUZUKI. Artificial Insemination with Canine Spermatozoa Frozen in a Skim Milk/Glucose-Based Extender. **Journal of Reproduction and Development**. V.58, p.290-294, 2008.

7. TRABALHOS

Obedecendo a uma sequencia de estudo foi realizado o desenvolvimento de quatro trabalhos com sequencia cronológica acontecimentos.

Trabalho 1 – Estudo visando observar a importância do tema a ser estudado e sua relevância no meio acadêmico - Bibliometria

Trabalho 2 – Estudo visando observar os efeitos deletérios da urina sobre as células espermáticas.

Trabalho 3 – Estudo visando observar o uso de dois métodos de descontaminação de ejaculados contaminados com urina (centrifugação X filtragem) associado a dois diluidores (Formulado em laboratório X Comercial)

Trabalho 4 – Relato de caso do uso de da técnica de descontaminação filtragem associada à diluidor comercial em sêmen de cão urospérmico para uso em protocolo de inseminação artificial.

Os trabalhos a seguir foram elaborados segundo as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

TRABALHO 1

Indicadores bibliométricos das publicações na base scopus a respeito do tema “sêmen de cães”

Bibliometric indicators of the scopus publications on the theme "dog semen"

J.L.G. Ramos¹, C. L. F. G. Ramos², E. Shimoda³ e I. C. N. da Cunha⁴

¹ Aluno de pós-graduação (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos dos Goytacazes – RJ

² Médica Veterinária Autônoma - Campos dos Goytacazes – RJ

³ Professor-Coordenador Mestrado Operacional – Universidade Candido Mendes - Campos dos Goytacazes – RJ

⁴ Professora - Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos dos Goytacazes – RJ

RESUMO

Esse artigo tem como objetivo apresentar os indicadores bibliométricos das publicações relacionadas ao tema “sêmen de cães” usando com referência a base Scopus no período de 2005 a 2014. A busca pelas informações, que se encontram neste trabalho, foi feita a partir da palavra-chave ‘Sêmen e\ou espermatozoides e\ou cães’. As informações relacionadas à evolução temporal, nome de autores, periódico, afiliação, veículos de comunicação e país foram obtidas nos campos em que é possível refinar a busca. Observamos considerável número de artigos publicados no Mundo e no Brasil sobre o tema, evidenciando assim a importância do Brasil na pesquisa sobre o tema figurando em 5º lugar quando abordado em todas as áreas e em 2º na área de veterinária, bem como, apresentando a maior taxa de crescimento anual: 20,9% e 27,8%, Respectivamente. A pesquisa também apresentou a importância das instituições e pesquisadores brasileiros presentes entre as dez primeiras no número de publicações. Este trabalho vem contribuir na orientação de revisão teórica, fundamentação e relevância para pesquisadores interessados em trabalhar com o tema.

Palavras chave: Bibliometria, sêmen de cães, veterinária, inseminação artificial

ABSTRACT

This article aims to present the bibliometric indicators of publications related to the theme "dog semen" using the Scopus database from 2005 to 2014. The search for the information, which is found in this work, was made from the word " 'sperm and / or sperm and / or dog'. The information related to the temporal evolution, authors' names, periodicals, affiliation, communication vehicles and country were obtained in the fields in which it is possible to refine the search. We observed a considerable number of articles published in the World and in Brazil on the subject, thus evidencing the importance of Brazil in the research on the subject appearing in 5th place when approached in all areas and 2nd in the veterinary area, as well as presenting the highest annual growth rate: 20.9% and 27.8%, respectively. The research also presented the importance of Brazilian institutions and researchers present among the top ten in the number of publications. This work contributes to the orientation of theoretical revision, foundation and relevance for researchers interested in working with the theme.

Keywords: Bibliometrics, dog semen, veterinary, artificial insemination

INTRODUÇÃO

Embora em estratégias de conservação *in situ*, tais como a preservação do habitat são geralmente a melhor maneira de preservar a biodiversidade, outras estratégias de salvamento, tais como a criopreservação de germoplasma são por vezes necessárias. Criopreservação de Germoplasma envolve o congelamento de gametas, embriões, tecidos gonadais ou tecidos somáticos de espécies ameaçadas de extinção (Silva *et al.*, 2015).

Durante muito tempo, as pesquisas na área de biotecnologia da reprodução se restringiram a estudos com animais de produção e somente a partir da década de 90, com o interesse na preservação da biodiversidade é que a espécie canina mereceu maior atenção. Aspecto este evidenciado pelo fato da espécie canina constituir-se modelo experimental para canídeos ameaçados de extinção, dentre eles o lobo-guará

(*Chrysocyon brachyurus*), cachorro-do-mato vinagre (*Spheothos venaticus*), e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), espécies da fauna brasileira (Ribeiro *et al.*, 2010).

As biotécnicas reprodutivas mais utilizadas na reprodução assistida em cães são a inseminação artificial (Makloski, 2012) e a preservação do sêmen (Madeira *et al.*, 2010). Esta última tem sido realizada de duas maneiras: por meio do resfriamento (Wittayarat *et al.*, 2012), que objetiva a utilização do sêmen a curto prazo, e da congelamento (Futino *et al.*, 2010), que mantém o sêmen viável por tempo indeterminado.

A inseminação artificial (IA) na espécie canina tem sido bastante utilizada na atualidade, contudo são necessários maiores conhecimentos e controle dos fatores que podem influenciar seu sucesso. Assim, diversos estudos são conduzidos visando encontrar metodologias de preservação de gametas, que permitam uma perda mínima da qualidade do sêmen, maior eficácia na determinação do momento ideal para a inseminação e utilização de uma via de inseminação eficiente e de menor risco ao animal (Hori, *et al.* 2011 e Hayashi *et al.* 2013).

O avanço do conhecimento produzido pelas pesquisas tem que ser transformado em informação acessível para a comunidade científica. Portanto, a pesquisa é desenvolvida em um contexto de troca. A publicação dos resultados de pesquisa tem três objetivos: divulgar descobertas científicas, salvaguardar a propriedade intelectual e alcançar a fama (Okubo, 1997).

A publicação é para a maioria daqueles que atuam na pesquisa, não só um indicador, mas o produto final de todo um esforço criativo. Dessa forma, qualquer contribuição só é reconhecida após ser publicada, julgada e incorporada, de alguma maneira, aos conhecimentos já existentes. O ciclo do conhecimento só se completa após a aceitação da descoberta por outros cientistas da mesma área e isso se dá através da publicação (Herculano e Norberto, 2012).

Dentre os métodos quantitativos utilizados para medir e avaliar o conhecimento científico encontra-se a bibliometria, a cienciometria e a informetria. Cada um deles destina-se a medir, sob enfoques distintos, aspectos específicos do conhecimento (Vanti, 2002)

A bibliometria tem como objetos de estudo os livros ou as revistas científicas, cujas análises se vinculam à gestão de bibliotecas e bases de dados; assim esta se caracteriza como uma técnica quantitativa e estatística de medição dos índices de produção e disseminação do conhecimento científico (Beuren e Zonatto, 2014).

A pesquisa acadêmica é fundamentada em revisões teóricas consistentes, ou seja, análise crítica de trabalhos publicados sobre dado tema e assim torna possível levantar o que já foi publicado sobre o tema e mapear quem já escreveu e o que já foi escrito, o que gera uma sustentação para o desenvolvimento de novos trabalhos. Existe uma relação entre os trabalhos mais importantes e os citados com maior frequência. Técnicas como a Bibliometria são usadas para identificar os trabalhos e autores mais importantes a respeito do tema pesquisado. Contudo, não existem publicações sobre quantificação ou bibliometria sobre o estudo de sêmen de cães em pesquisas.

Portanto o objetivo do presente trabalho é apresentar indicadores bibliométricos das publicações relacionadas ao tema “sêmen de cães” usando com referência a base Scopus.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado através da coleta de informações na base de busca de artigos científicos Scopus, disponível no Portal Periódicos da Capes. A busca foi realizada em junho de 2016, sendo utilizada a opção de busca rápida, que retorna as publicações que tenham a palavra digitada no título, no resumo ou nas palavras-chaves.

A busca pelas informações, que se encontram neste trabalho, foi feita a partir da palavra-chave ‘Sêmen e\ou espermatozoides e\ou cães’. E as informações relacionadas à evolução temporal (2005 – 2014), nome de autores, periódico, afiliação, veículos de comunicação e país foram obtidas nos campos em que é possível refinar a busca.

A análise temporal, foi realizada a partir de equações de regressão exponenciais do número de publicações sobre aglomerados produtivos e assuntos gerais em função do ano, determinou-se uma equação para cada tema. Os valores de cada variável foram linearizados mediante a aplicação de logaritmo, de forma que o coeficiente angular da equação indica a taxa de crescimento em dado período.

Para fazer a análise de concentração das outras informações do presente trabalho, como, países, autores, universidades e veículos de comunicação foi realizada a comparação dos dez primeiros contribuintes de cada caso em relação ao total de publicações.

Por se tratar de uma pesquisa prévia (início de Doutorado) esta foi realizada em junho 2016 com busca dos dados de 10 anos (2005 a 2014) não incluindo o ano de

2015 devido ao atraso em alguns casos na inclusão por alguns periódicos das publicações o que poderia gerar erros nas avaliações.

O principal objetivo deste trabalho foi apresentar indicadores bibliométricos relacionadas ao tema “sêmen de cães” no período de 10 anos (2005 a 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta em porcentagem um ranking da participação dos países a respeito do tema estudado e podemos observar a dominância dos Estados Unidos da América (EUA) na produção quando observamos a pesquisa em todos os temas 25,7 % das publicações bem como em relação ao tema estudado em Todas as áreas (30,1%) e Veterinária (17,4%). Quando observamos a participação brasileira, ranqueado como décimo quinto em todos os temas e com característica ainda melhor quando observamos o tema do estudo, ocupando respectivamente a posição de quinto e segundo em todas as áreas e veterinária, demonstrando um País envolvido com pesquisa, evidenciado em estudos de Cross *et al.*, (2017) que apontam o Brasil em décimo terceiro como produtor de pesquisas globalmente e a importância do tema para pesquisa no País para a área da Veterinária.

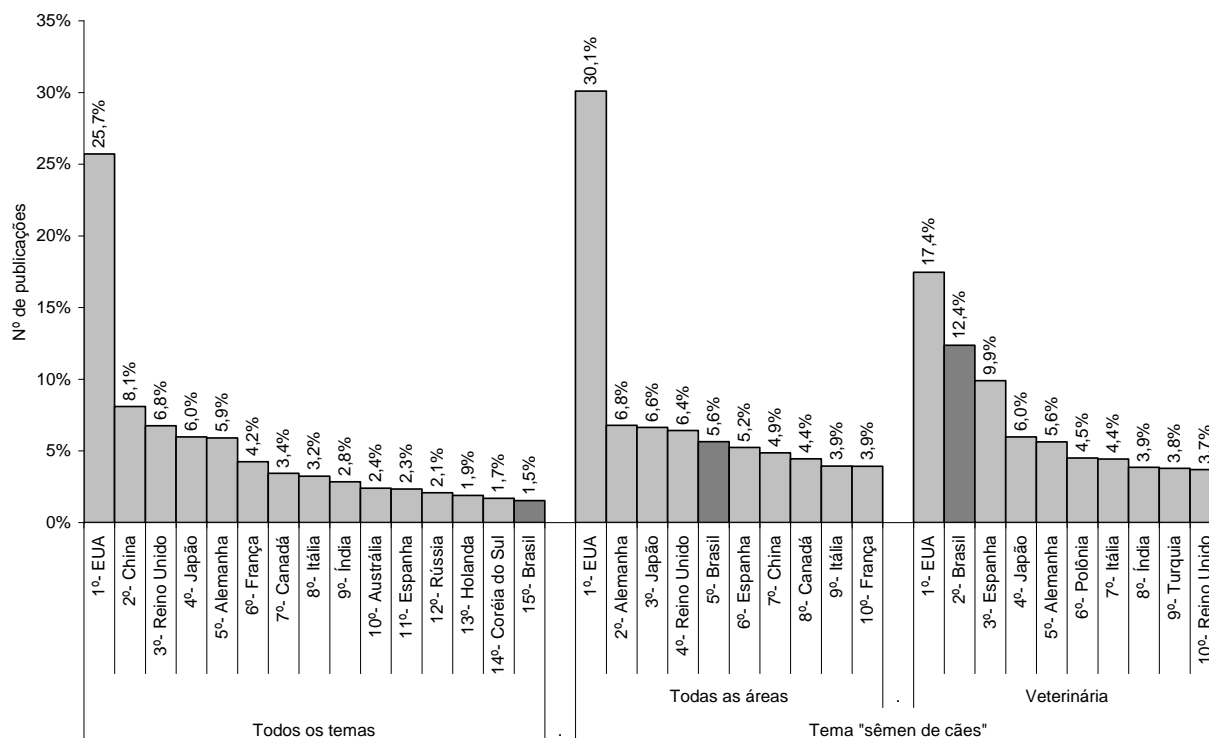


Figura 1 – Ranking dos Países quanto a Pesquisa em todo o Mundo : Todos os temas e Sêmen de Cães (todas as áreas e veterinária)

Os gráficos apresentam significância e o coeficiente de determinação do número de publicações de todos os temas (Graf. 1 e 2), tema sêmen de cães em todas as áreas (Graf. 3 e 4) e tema sêmen de cães na área da veterinária(Graf. 5 e 6) no Mundo e Brasil no período estudado com todos significantes ($P < 0,001$) e $R^2 > 60,5\%$.

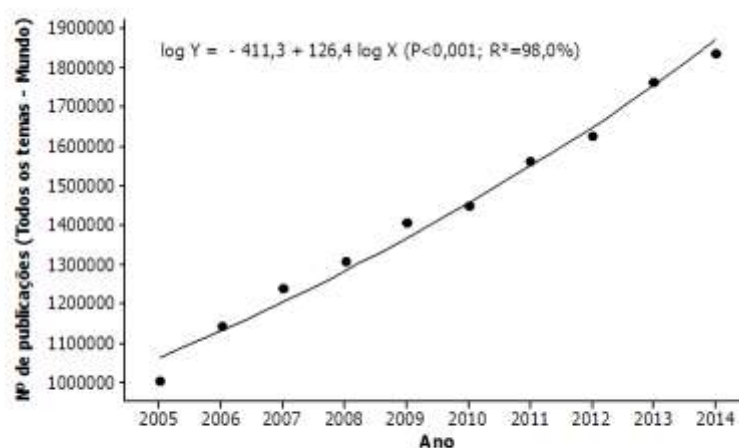


Gráfico 1 - significância e o coeficiente de determinação do número de publicações de todos os temas - Mundo

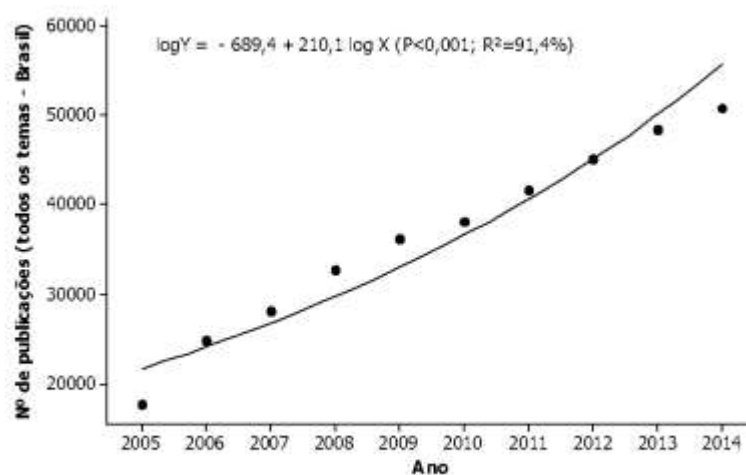


Gráfico 2 - significância e o coeficiente de determinação do número de publicações de todos os temas - Brasil

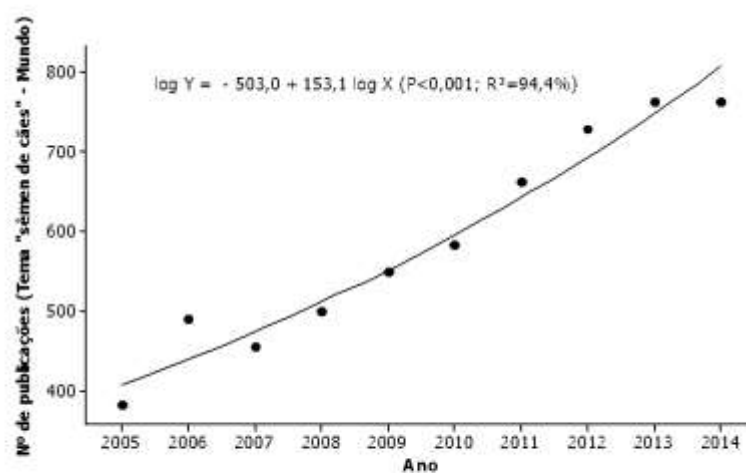


Gráfico 3 - significância e o coeficiente de determinação do número de publicações tema sêmen de cães - Mundo

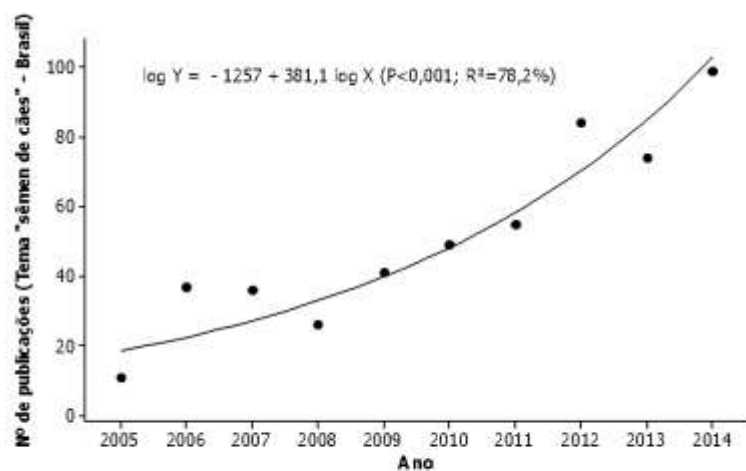
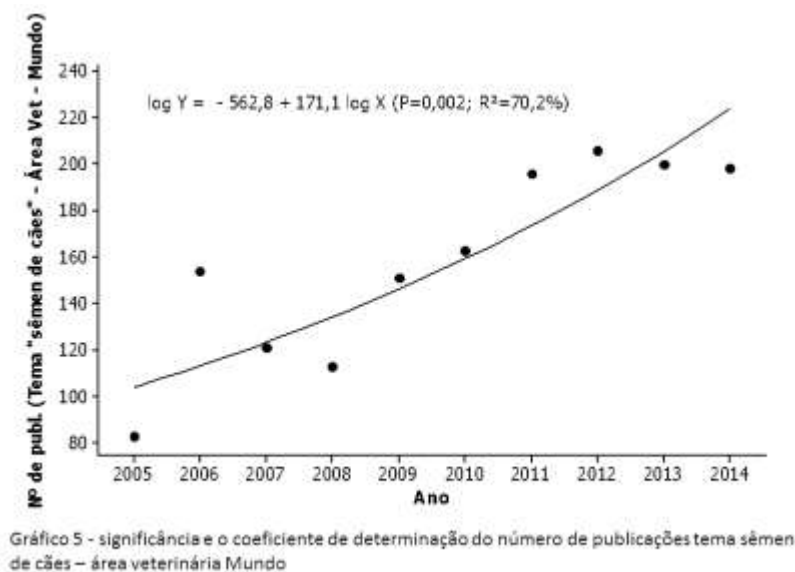


Gráfico 4 - significância e o coeficiente de determinação do número de publicações tema sêmen de cães - Brasil



A Fig. 2 nos apresenta a taxa de crescimento anual no Mundo e Brasil respectivamente da pesquisa em todas as áreas e temas (6,5%) e (11,0%); sobre o tema estudado em todas as áreas (7,9%) e (20,9%) e na área de veterinária (8,9%) e (27,8%), apresentando estes resultados como particularidade o crescimento da pesquisa e evidenciando o Brasil como uma potência emergente com taxas de crescimento maiores que o Mundo, evidenciado em estudos que observaram na Web of Science que a mais de 20 anos a pesquisa brasileira tem aumentos anuais de produtividade pelos setores acadêmicos (Cross *et al.*, 2017) e principalmente com relação ao tema estudado com taxas superiores tanto em todas as áreas e veterinária demonstrando o interesse e relevância da pesquisa e a importância do País.

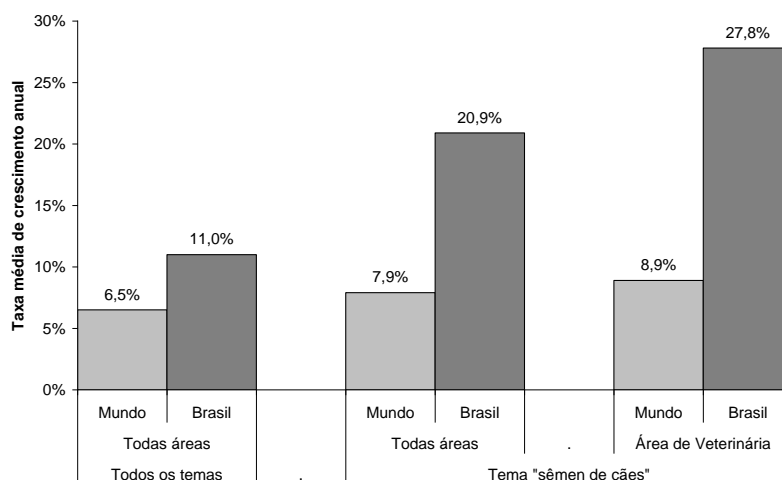


Figura 2 - Taxa de crescimento anual das publicações todos os temas e tema Sêmen de cão no Mundo e Brasil

O crescimento da pesquisa no País também tem influência nos últimos anos da atuação do Governo com investimentos constantes em pesquisas que se tonam evidentes desde 1990 quando o governo estabeleceu objetivos e metas em despesas domésticas no desenvolvimento de pesquisas com porcentagem sobre o Produto Interno Bruto (PIB) e mantido nos últimos anos como em 2014 em que se estabeleceu 2% (PIB) até 2019, isto como parte integrante da Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação (ENCTI) que objetiva aumento na produtividade, e desenvolvimento social e econômico (Cross *et al.*, 2017).

O tema estudado possui como característica a possibilidade de ser incluído em diferentes linhas de pesquisa estando presente em várias áreas como: química, física, bioquímica, farmacologia, neurociências, veterinária entre outras, porém, a maior parte dos estudos estão incluídos nas áreas de: bioquímica e genética, medicina, ciências veterinárias e veterinária com uma inversão de posicionamento no ranking de maior número de publicações destas quatro principais áreas na avaliação no Mundo e Brasil, com a Veterinária e a Ciências Agrárias estando em Mundo (5° e 4°) e Brasil (1° e 2°) observado na figura 3 e demonstrando que o tema possui grau de relevância para estudo no mundo e ainda mais no Brasil e comprovado em estudos recentes onde demonstrou que após a Clínica Médica, os maiores campos de pesquisa apresentados por indicadores científicos essenciais (ICE) no Brasil, por meio da produção de publicações, são ciência de plantas e animais e ciências agrícolas (Cross *et al.*, 2017), sendo ainda evidenciado a influência e importância do estudo no País através do ranking das instituições que mais publicam em todas as áreas, onde as universidades brasileiras estão presentes com relevante participação no Mundo com presença de três entre as dez primeiras (1° - UNESP, 3°-USP e 7°-UFMG). Na observação do tema estudado na área de veterinária no mundo encontramos também três universidades brasileiras entre as dez primeiras (1° – UNESP, 3°-USP E 10° – UECE), demonstrando e inferindo sobre a importância da obtenção e criação de grupos e linhas de pesquisa promovendo o crescimento e produtividade das pesquisas e por consequência das publicações (Figura 4).

Esses resultados corroboram Cross *et al.*, (2017) quando apontam o eixo São Paulo – Rio de Janeiro como os que mais publicam, fato este que pode ser relacionado a USP e UNESP que são as que mais publicam em nosso país com ao menos 30% de toda

produção nacional e a Participação da UERJ com faotr de impacto médio mais alto das universidades brasileiras e maior porcentagem de artigos no 1% dos mais importantes e citados no Mundo e a UFRJ e UFF que apresentam que apresentam altas taxas de colaboração da indústria.

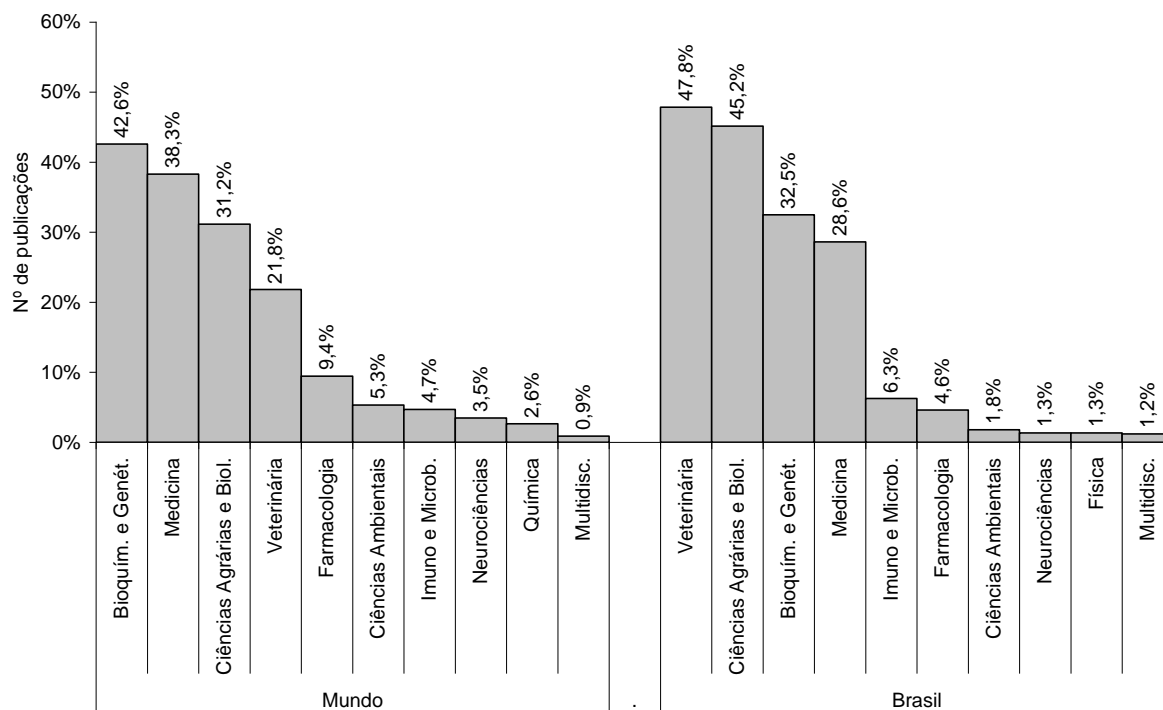


Figura 3 - Áreas de pesquisa que o temas estudado (sêmen de cães) pode figurar com ranqueamento em porcentagem das com maior publicação no Mundo e Brasil.

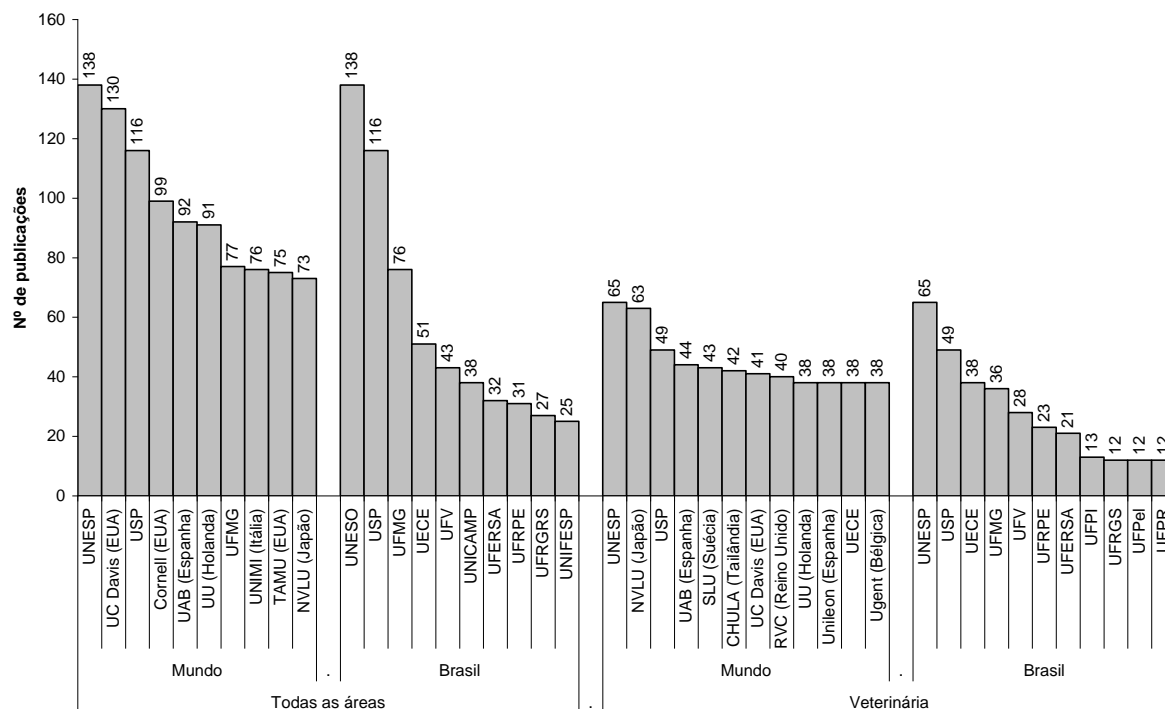


Figura 4 – Instituições de pesquisa que mais apresentam publicações sobre o tema estudado em Todas as áreas e veterinária no Mundo e Brasil.

Um das principais funções dos estudos bibliométricos é apontar os principais estudos e identificar o que denominamos de elite de pesquisadores em uma determinada área de conhecimento (Ferreira, 2010), o que podemos observar na figura 5, que apresenta os principais autores no Mundo e Brasil sobre o tema em todas as áreas e na veterinária, tornando-se importante para a identificação de Frentes de Pesquisas de uma área científica específica, representada por um conjunto de autores, contribuindo ainda para observações e citações de uma literatura recente, bem como evidenciar os principais meios e fontes para publicações no Mundo e Brasil (Figura 6), que em nossa avaliação fica evidente uma concentração das publicações no Mundo na Theriogenology e no Brasil tanto em todas as áreas como na Veterinária também temos o mesmo direcionamento porém sem a concentração evidenciada na avaliação do Mundo, mas com a presença de outros periódicos para publicações: *Animal Reproduction Science*, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *Reproduction in Domestic Animal* e *Pesquisa Veterinária Brasileira*, o que pode demonstrar dificuldades dos pesquisadores para publicação e/ou uma divisão em busca de novos periódicos

ocasionado tanto pelo grau de importância das pesquisas ou pelo sistema de avaliação das instituições de pesquisas que preconizam a publicação como fonte de avaliação das mesmas e pesquisadores.

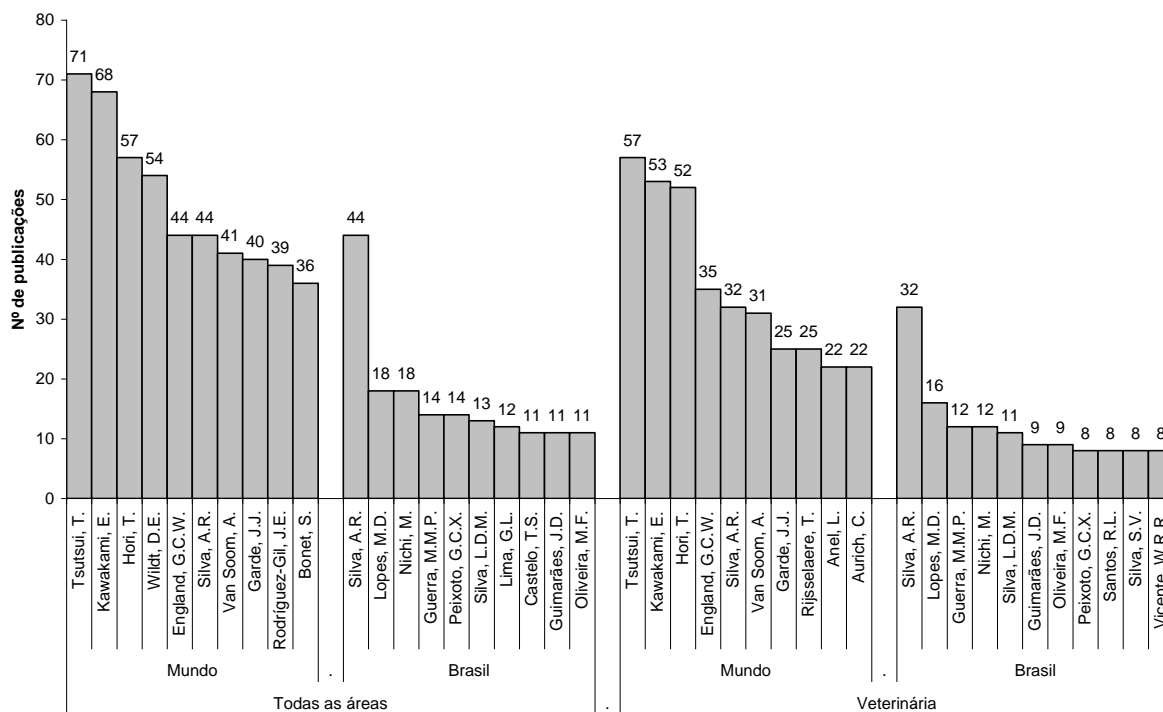


Figura 5 – Principais Autores com maior número de publicações sobre o tema estudado em Todas as áreas e veterinária no Mundo e Brasil.

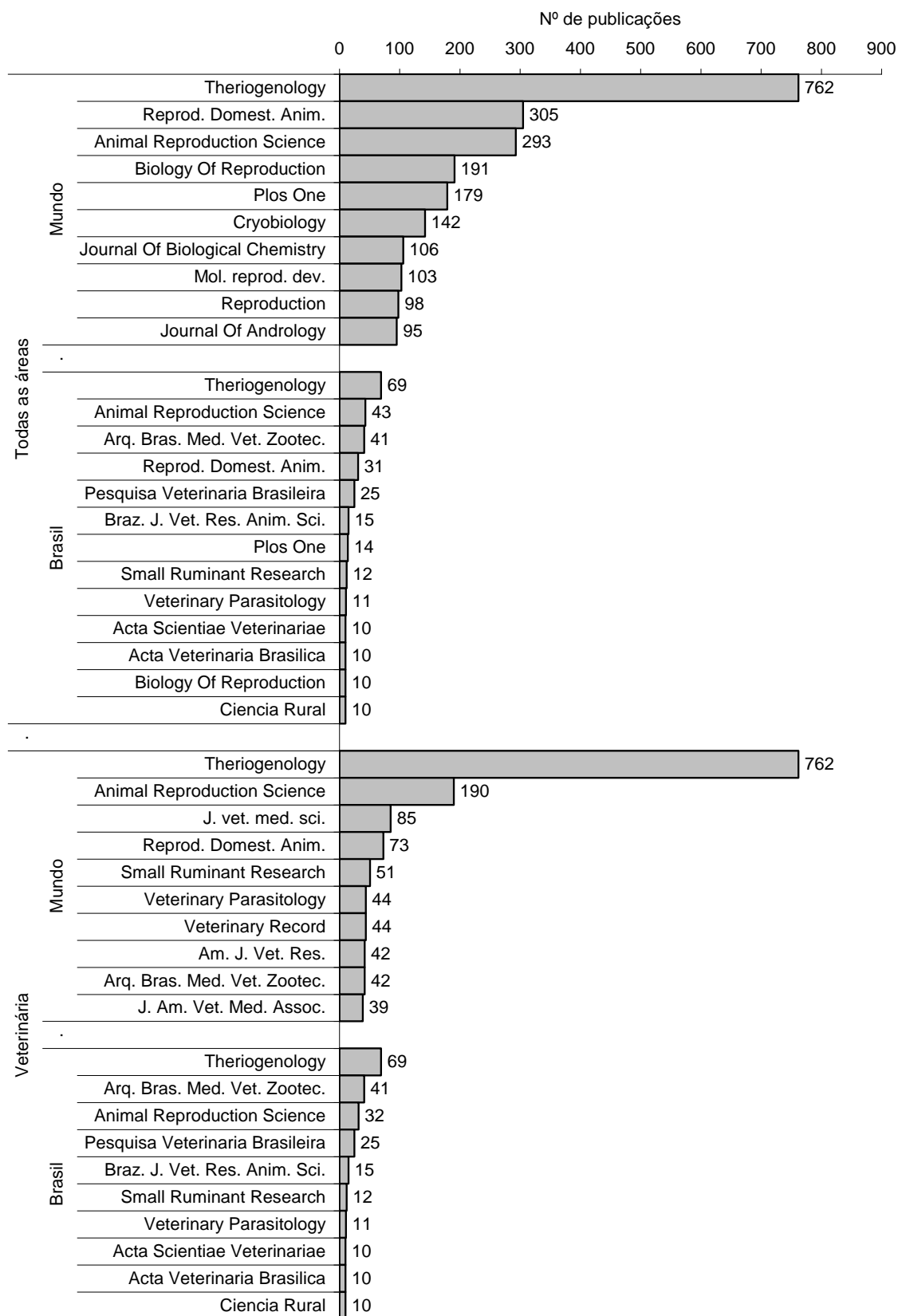


Figura 6 – Principais Fontes (periódicos\revistas) com maior número de publicações sobre o tema estudado em Todas as áreas e veterinária no Mundo e Brasil.

CONCLUSÕES

O Tema estudado (Sêmen de Cães) apresenta importante grau de relevância e tem atraído a atenção para publicação internacional e nacional no período de dez anos estudado (2005-2014) demonstrado pelo aumento da taxa de crescimento anual de publicações.

Com a análise bibliométrica conseguimos identificar os principais autores, instituições e periódicos que trabalham o tema, pudemos observar a contribuição da pesquisa brasileira tanto pela maior taxa de crescimento, influência de autores e instituições que estão entre os que mais publicam, bem como a presença de periódicos nacionais com grau de importância para pesquisa.

As abordagens teóricas, práticas e descritivas da bibliometria contribuem para a adequada mensuração da informação e produção de indicadores, que funcionam como ferramenta de relevância crucial para observação e tomada de decisão sobre temas e/ou assuntos estudados.

REFERÊNCIAS

BEUREN, I.M.; ZONATTO, V.C.S. Perfil dos artigos sobre controle interno no setor público em periódicos nacionais e internacionais **Rev. Adm. Pública** V.48, n.5, p.1135-1163, 2014.

CROSS, D.; THOMSON, S.; SINCLAIR, A. Research in Brazil. **Clarivate Analytics**. p.73, 2017

FUTINO, D.O.; MENDES, M.C.B.; MATOS, M.N.L.; et al. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. **Reprod. Dom. Anim.**, v.45, p.214-220, 2010

HAYASHI, K.; MORITA, R.; ASO, T.; et al. Evaluation of Transcervical Insemination using Frozen Semen by Flexible Endoscope in Dogs. **J. Vet. Med. Sc.** v.75, n.3, p. 315–318, 2013.

HERCULANO, R.D.; NORBERTO, A.M.Q. Análise da produtividade científica dos docentes da Universidade Estadual Paulista, campus de Marília/SP. **Persp. Ciênc. Inf.**, v.17, n.2, p.57-70, 2012.

HORI, T.; MATSUDA, Y.; KOBAYASHI, M.; et al. Comparison of Fertility on Intrauterine Insemination between Cryopreserved Ejaculated and Cauda Epididymal Sperm in Dogs. **J. Vet. Med. Sc.** v. 73, n.12, p.1685–1688, 2011.

MADEIRA, V.L.H.; MONTEIRO, C.L.B.; BARBOSA, C.C.; et al. Efeito de diferentes protocolos de descongelamento sobre o sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco em pó (ACP®). **Ciênc. Anim. Bras.** v.11, p.845-852, 2010.

MAKLOSKI, C. L. Clinical Techniques of Artificial Insemination in Dogs. **Vet Clin Small Anim.** V.42, p. 439–444, 2012.

OKUBO, Y. “Bibliometric Indicators and Analysis of Research Systems: Methods and Examples”, OECD Science, Technology and Industry Working Papers, 1997/01, OECD Publishing. Systems, 1997.

RIBEIRO, A.P.C. ; PIRES, E.A.; APPARÍCIO, M.; et al. Maturação in vitro de oócitos caninos: aspectos fisiológicos e sua relação com a evolução da técnica **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.34, n.1, p.50-57, 2010.

SILVA, A.R.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; *et al.* Cryopreservation in mammalian conservation biology: current applications and potential utility. **Res. Rep. Biodiv. Stud.**, V.4, p.1–8, 2015.

VANTI, N . **Da Bibliometria à Webometria:** uma exploração conceitual dos mecanismos utilizados para medir o registro da informação e a difusão do conhecimento. **Ciênc. da Inf.**, 31, n.2, p. 152-162, 2002

WITTAYARAT, M.; KIMURA, T.; KODAMA, R.; et al. Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin c in combination with green tea polyphenol. **Cryo Lett**, v.33, p.318-326, 2012

TRABALHO 2

Avaliação sêmen canino contaminado com urina em meios refrigerado e aquecido

Evaluation canine semen contaminated with urine and heated refrigerated means

J.L.G. Ramos¹, C. L. F. G. Ramos², E. Shimoda³ e I. C. N. da Cunha⁴

¹ Aluno de pós-graduação (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos dos Goytacazes – RJ

² Médica Veterinária Autônoma - Campos dos Goytacazes – RJ

³ Professor-Coordenador Mestrado Operacional – Universidade Candido Mendes - Campos dos Goytacazes – RJ

⁴ Professora - Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos dos Goytacazes – RJ

RESUMO

A contaminação do sêmen canino por urina pode ser pela emissão de urina junto com o sêmen (urospermia), ou pela ejaculação em direção a bexiga (ejaculação retrógrada), que pode ocorrer tanto na monta natural, na coleta por estimulação peniana ou durante a eletro-ejaculação. Os efeitos que a urina causa sobre o ejaculado mesmo com o aumento de estudos sobre o tema ainda não estão totalmente elucidados. O presente estudo teve como objetivo determinar o efeito da urina total sobre o sêmen em diferentes meios de incubação: aquecido (37°C) e resfriado (5°C). As amostras de ejaculados de 10 cães foram incubadas com urina total na temperatura de 37°C e 5°C por 60 minutos, sendo avaliadas neste período em intervalos de 15 minutos. A urina reduz drasticamente a motilidade espermática, e este efeito está associado a sua hiperosmolaridade quando comparada com a do ejaculado: 245 – 295 (média 264±15) mOsmol.L-1 e Urina=1004 a 1248 (média 1130±89,3) mOsmol.L-1. Observou-se que o efeito deletério da urina é mais intenso após os 30 minutos com médias: Meio aquecido (Mot. < 16,10±0,92 %, Vig. <2,20±0,17 e , IM < 44,20±0,90%) e Resfriado (Mot. < 30,60±1,43 %; Vig. < 2,25±0,08 ; IM<46,80±1,72). Podemos assim concluir que o sêmen de cão após contaminação com urina possui um período de 30 min para uso de metodologias de descontaminação e que a manutenção deste em ambiente refrigerado promove melhores resultados na proteção da célula espermática.

Palavras chave: sêmen de cães, contaminação sêmen, reprodução, cão

ABSTRACT

Contamination of canine semen through urine can be by the emission of urine along with semen (urospemia), or by ejaculation towards the bladder (retrograde ejaculation), which can occur either in natural mating, collection by penile stimulation or during electrolysis -ejaculation. The effects that urine causes on ejaculate even with the increase of studies on the subject are not yet fully elucidated. The aim of the present study was to determine the effect of total urine on semen in different incubation media: heated (37 °C) and cold (5 °C). The ejaculate samples from 10 dogs were incubated with total urine at 37 ° C and 5 ° C for 60 minutes, being evaluated in this period at 15 minute intervals. Urine significantly reduces sperm motility, and this effect is associated with its hyperosmolarity when compared to ejaculate: 245-295 (mean 264 ± 15) mOsmol.L-1 and Urine = 1004 to 1248 (mean 1130 ± 89.3) mOsmol.L-1. It was observed that the deleterious effect of urine is more intense after 30 minutes with a mean: Heated medium ($<16.10 \pm 0.92\%$, Vig. $<2.20 \pm 0.17$ and, IM $<44, 20 \pm 0.90\%$) and cooled (Mot. $<30.60 \pm 1.43\%$, Vig. $<2.25 \pm 0.08$, IM $<46.80 \pm 1.72$). We can conclude that dog semen after contamination with urine has a period of 30 min for use of decontamination methodologies and that the maintenance of this in a refrigerated environment promotes better results in the protection of the sperm cell.

Keywords: semen of dogs, contamination, semen, reproduction, dog

INTRODUÇÃO

O avanço das biotecnologias de reprodução assistida tem despertado grande interesse da comunidade científica no que concerne à preservação de espécies carnívoras ameaçadas de extinção. Desde então, o desenvolvimento de biotecnologias utilizando animais domésticos filogeneticamente próximos, como modelo experimental, tem ganhado destaque. O cão doméstico vem desempenhando importante papel, permitindo a pesquisa, o aprimoramento e a aplicabilidade dessas tecnologias às espécies silvestres ameaçadas (Luvoni, 2000; Silva *et al.*, 2003; Paula, 2011).

A inseminação artificial (IA) na espécie canina tem sido bastante utilizada na atualidade, contudo são necessários maiores conhecimentos e controle dos fatores que

podem influenciar seu sucesso. Assim, diversos estudos são conduzidos visando encontrar metodologias de preservação de gametas, que permitam uma perda mínima da qualidade do sêmen, maior eficácia na determinação do momento ideal para a inseminação e utilização de uma via de inseminação eficiente e de menor risco ao animal (Hori *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2013).

Cada espécie tem sua particularidade quanto à obtenção e congelamento de gametas, em protocolos de coleta de sêmen, e o sêmen pode ser contaminado com urina, conforme descrito em mamíferos como humanos, cavalos, raposas da floresta (*Cerdocyon thous*) e ursos pardos (Makler *et al.*, 1981; Griggers *et al.*, 2001; Souza e Paz, 2011; Gomes-Alves *et al.*, 2014). Nos canídeos é relatada a contaminação por urina, seja pela emissão de urina junto com o sêmen (urospermia), ou pela ejaculação em direção a bexiga (ejaculação retrógrada), que pode ocorrer tanto na monta natural, na coleta por estimulação peniana ou durante protocolos de eletro-ejaculação (Santos *et al.*, 2011), contaminação essa provocada devido a falha na sequência natural da ejaculação anterógrada (emissão seminal, fechamento da região do colo da bexiga e expulsão seminal pela uretra peniana) com a falha no fechamento do colo da bexiga.

Quando os espermatozóides são submetidos a um ambiente contaminado por urina, a primeira alteração a ser percebida é a redução na motilidade (Griggers *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2011) e os efeitos deletérios evidenciados relacionam-se principalmente a diferença no pH e osmolaridade (Makler *et al.*, 1981; Griggers *et al.*, 2001).

No processamento de material genético de animais em via de extinção, toda amostra colhida deve ser aproveitada, desta forma, objetivamos com esse trabalho avaliar o efeito da urina total sobre espermatozoide em diferentes tempos (0, 15, 30, 45 e 60 min) e sob diferentes temperaturas de armazenamento (37°C e 5°C) e assim obter parâmetros para possíveis momentos e processos de descontaminação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

As amostras de ejaculados foram coletadas de 10 cães de criadores particulares: 8 Pugs, estes com peso médio de $7,4 \pm 0,2$ kg (variando de 7,2-7,8 Kg) e idade média $3,8 \pm 1,1$ anos (variando de 2 – 6 anos); 2 labradores com peso médio de $33,5 \pm 1,5$ Kg (pesos de 35 e 32 Kg) e idade média $5,5 \text{ anos} \pm 1,5$ (idades de 4 e 7 anos)

Coleta de sêmen e urina

As amostras de sêmen foram coletadas duas vezes na semana com intervalo de 72 h, sendo utilizada apenas a segunda amostra no estudo. Esta foi obtida por meio de manipulação digital sem a presença de uma cadela em estro, sendo utilizada a segunda fração dos 10 ejaculados, e as amostras tiveram início às avaliações e protocolos experimentais em laboratório não excedendo o tempo de 15 min após a coleta.

A urina autóloga foi coletada após a coleta de sêmen através da micção espontânea dos animais.

Protocolo Experimental

O Experimento foi realizado em no laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre - ES.

Após coleta os ejaculados dos 10 cães foram divididos e incubados com urina total autóloga na proporção de 1:1 durante 1 h nas temperaturas de 37°C (banho maria) e 5°C (geladeira Temperatura controlada). Assim podemos simular as possibilidades de acontecimentos *in vivo* através de protocolos de eletroejaculação com a possibilidade de exposição so sêmen a urina bem como formas de acondicionamento e transporte do mesmo quando em contato com a urina.

As amostras foram avaliadas a cada 15 minutos durante período de incubação nos momentos: 0, 15, 30, 45 e 60 minutos de incubação.

Em cada momento, após homogeneização, 500 μ L da solução incubada era centrifugada a (800xg por 5 min) e resuspendidas em diluente formulado - Kenney (2,4 g de leite em pó, 4,9 g de glicose, 0,75 mg de sódio Bicarbonato, 20 mg de gentamicina,

1000 mL de água bidestilada, pH 6,5-7,3 e osmolaridade de 340-380 mOsm.L-1) para avaliação das variáveis: Motilidade, Vigor, Integridade de Membrana e morfologia.

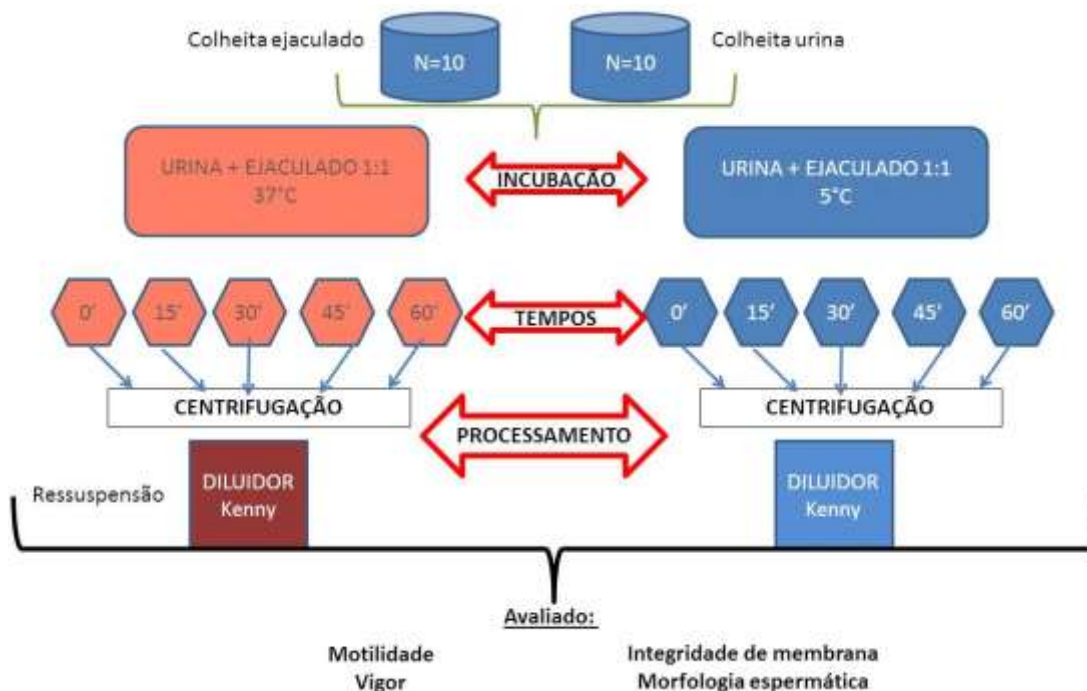


Figura 1 – Diagrama experimental: avaliação da contaminação de ejaculado canino com urina em duas temperaturas de incubação (37 °C e 5 °C) no período de 1 h.

Avaliação do sêmen e da urina

O sêmen foi avaliado quanto as suas características macroscópicas: cor, aparência e volume; avaliado quanto as suas características físico-químicas como: pH utilizando-se o modelo universal de 0-14 (Phmetro de Bancada, PH 0-14 KASVI – K39-1014B); a Osmolaridade avaliada com uso do Osmômetro 5004-Micro-Osmette™ (Precision Micro Systems Inc.).

As avaliações microscópicas se fizeram com a aferição da concentração do sêmen com a diluição na proporção de 1:200 em formol salina e os espermatozoides contados em câmara de Neubauer; a análise morfológica a amostra utilizada na proporção de 1:10 e ambos procedimetos avaliados em microscopia de contraste de fase (System Microscope Olympus Bx 41) (CBRA, 2013).

A motilidade e vigor foram avaliadas por meio de método subjetivo em microscopia de contraste de fase sendo utilizado uma alíquota de sêmen de 10µL em

lâmina e lamínula aquecida a 37°C. O resultado para motilidade foi expresso em porcentagem (0 – 100%) e vigor em escore (0 – 5) (CBRA, 2013).

A integridade e funcionalidade da membrana espermática foi avaliada por meio do teste hipo-osmótico (HOST) a partir de 10 µl de alíquotas de amostras incubadas a 37°C durante 10 minutos em água destilada (Solução hiposmótica). Após a incubação, 10µL foram retirados da amostra, colocados entre lâmina e lamínula para a avaliação da morfologia espermática em microscópio óptico com contraste de fase. Foram contados 200 espermatozóides e aqueles que estavam com a cauda enrolada foram considerados como íntegros (Cunha, 2008).

As amostras de urina foram avaliadas pelo laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal do Espírito Santo com determinação de bilirrubina, cetonas, densidade, glicose, leucócitos, nitrito, pH, proteína, sangue e urobilinogênio. A osmolaridade da urina foi avaliada por um osmômetro 5004-Micro-Osmette™ (Precision Micro Systems Inc.).

Análise Estatística

Os dados foram tabulados e organizados em planilha do Microsoft Excel e após os resultados submetidos a teste t de comparação de médias e sua significância determinadas mediante utilização do aplicativo Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), versão 9.1 (2007). As diferenças estatísticas foram consideradas em $P < 0,05$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

RESULTADOS

O sêmen fresco mostrou um volume médio de $3,0 \pm 0,5$ mL, 264 ± 53 milhões de espermatozóides.mL⁻¹, $85 \pm 5\%$ de motilidade total e $4 \pm 0,5$.

Os valores dos parâmetros observados na urina dos cães não apresentaram alterações evidentes a não ser na variação da osmolaridade (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultado da análise de urina autóloga dos cães (n=10)

Variável	Resultado
Aspecto	Límpido
Cor	Amarelo-claro
Bilirrubina	Normal
Cetona	Normal
Densidade	1,028 ± 0,008
Glicose	Normal
Leucócitos	Negativo
Nitrito	Normal
Osmolaridade (mOsmol.L-1)	1004 a 1248 (\bar{X} = 1130±89,3)
pH	7 a 7,2 (\bar{X} = 7,08 ± 0,8)
Proteína	70 ± 15
Sangue	Negativo
Urobilinogênio	Normal

Durante a incubação do sêmen com urina sob as duas temperaturas propostas (37°C e 5°C), a motilidade, o vigor e integridade de membranas espermáticas apresentaram padrão decrescente com o avanço do tempo, observando-se uma melhor avaliação na motilidade quando o sêmen apresenta-se resfriado quando observamos o tempo de 30 minutos ($P < 0,05$); a morfologia espermática não sofreu alteração nos tempos e métodos de incubação avaliados (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

Tabela 2 – Avaliação da motilidade espermática de amostras de sêmen canino incubado com urina total (1:1) sob duas temperaturas (37°C e 5° C), nos diferentes momentos de incubação (tempos)

Tempo	Aquecido (37°C)	Resfriado (5°C)
0	85,20±1,10 A	88,00±1,02 A
15	47,10±1,10 A	44,60±0,87 A
30	16,10±0,92 B	30,60±1,43 A
45	9,20±0,44 A	10,70±0,79 A
60	0,00±0,00 A	0,00±0,00 A

Médias seguidas por uma mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student

Tabela 3 – Avaliação do vigor espermático de amostras de sêmen canino incubado com urina total (1:1) sob duas temperaturas (37°C e 5° C), nos diferentes momentos de incubação (tempos)

Tempo	Aquecido	Resfriado
0	4,25±0,08 A	4,35±0,08 A
15	3,30±0,08 A	3,40±0,07 A
30	2,20±0,17 A	2,25±0,08 A
45	1,15±0,11 A	1,10±0,07 A
60	0,00±0,00 A	0,00±0,00 A

Médias seguidas por uma mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student

Tabela 4 – Avaliação da integridade de membrana de amostras de sêmen canino incubado com urina total (1:1) sob duas temperaturas (37°C e 5° C), nos diferentes momentos de incubação (tempos)

Tempo	Aquecido	Resfriado
0	91,20±0,79 A	91,80±1,00 A
15	63,60±1,39 A	65,10±0,89 A
30	44,20±0,90 A	46,80±1,72 A
45	15,20±0,84 B	22,90±1,41 A
60	7,00±0,54 B	9,20±0,42 A

Médias seguidas por uma mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student

Tabela 5 - Avaliação da morfologia espermática de amostras de sêmen canino incubado com urina total (1:1) sob duas temperaturas (37°C e 5° C), nos diferentes momentos de incubação (tempos)

Tempo	Aquecido	Resfriado
0	89,70±0,97 A	91,50±0,78 A
15	88,00±0,95 A	89,30±0,80 A
30	85,50±0,76 A	87,70±0,93 A
45	84,20±0,80 A	86,80±1,01 A
60	82,70±0,62 A	85,60±0,75 A

Médias seguidas por uma mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student

DISCUSSÃO

A análise da urina apresentou característica de normalidade para um exame de urinálise (Whitbread, 2016; Santos *et al.*, 2017), porém a variação da osmolaridade de 1004 a 1248 (média $1130 \pm 89,3$) mOsmol.L⁻¹ apresentou –se menor do que o observado por Santos *et al.* 2017, fato este possivelmente relacionado pela padronização da raça e do proprietários dos animais, porém não interferindo na ação deletéria desta sobre o ejaculado, com menor osmolaridade e que apresentou variação de 245 – 295 (média 264 ± 15) mOsmol.L⁻¹.

As alterações observadas com o decréscimo da motilidade e vigor até zero após 1h de incubação demonstram o efeito deletério progressivo que a urina produz sobre as células espermáticas a despeito da técnica de incubação utilizada, resultados semelhantes aos observados Santos *et al.*, (2011) trabalhando com sêmen de cães e Griggers *et al.*, (2001) em estudos com cavalos onde a osmolaridade superior a 500 mOsmol.L⁻¹ propocionam a diminuição da motilidade, entretanto neste estudo verificamos que esse efeito é progressivo atingindo o seu ápice aos 30 minutos pós incubação, sendo a acentuação destes efeitos mais evidentes nas amostras de sêmen que foram mantidas aquecidas durante a incubação quando comparado com as amostras que foram mantidas sob refrigeração, no que tange a motilidade ($P < 0,05$), o que também foi observado (em resultados preliminares) por Ramos *et al.*, (2017) trabalhando com sêmen de cão incubados na mesmas temperaturas (37°C e 5°C) e usando diluidor BotuTurbo®, demonstrou que os efeitos deletérios aumentam em maior proporção após os 30 minutos nas amostras mantidas em ambiente aquecido, e assim comprovando que o resfriamento teve ação na atividade da célula espermática e de alguma forma provoca um decréscimo na ação deletéria presente no ambiente inóspito da hiperosmolaridade, corroborando com o que já foi apresentado, que esta ação deletéria está relacionada com o característica do ambiente e o tempo que o espermatozoide fica em contato no ambiente incompatível com suas necessidades fisiológicas (Makler *et al.*, 1981 e Santos *et al.*, 2017). Podemos ressaltar que o ambiente refrigerado reduz a atividade metabólica dos espermatozóides o que possibilita preservar parâmetros que indicam a qualidade como a motilidade e a integridade de membrana e assim sua viabilidade. Destacamos o

fato de que no ambiente refrigerado ocorre a diminuição e limitação na fertilidade, porém a qualidade demonstrada pela motilidade do sêmen canino refrigerado entre 4 °C e 5 °C se mantém (Vertegen *et al.*, 2005 e Cunha *et al.*, 2014).

O uso da centrifugação não interferiu na qualidade espermática e foi eficiente para avaliação nos tempos estudados corroborando com o já observado por Cunha e Lopes (2009) em estudos com sêmen de cães, Gomes-Alves *et al.*, (2014) em estudo com ejaculados urospermicos de Urso Marrom e Santos *et. al.*, (2017) em estudo de resfriamento sêmen de canino contaminados com urina; este estudo não teve objetivo de avaliar se somente a centrifugação é suficiente para promover a descontaminação de ejaculados contaminados com urina.

CONCLUSÕES

A integridade de membrana e a motilidade do sêmen canino incubado em urina total (solução hiperosmótica) em meio aquecido e resfriado são comprometidas após os 30 minutos de incubação, sendo a motilidade espermática afetada de forma mais efetiva quando a incubação se deu em meio aquecido.

Com base nesses resultados pode-se sugerir que o tempo máximo entre a coleta e a descontaminação de uma amostra de sêmen contaminado com urina não deve ultrapassar os 30 minutos, e ainda, que a amostra contaminada deve ser mantida resfriada até o momento da descontaminação, procedimento que proporciona melhores resultados.

REFERÊNCIAS

- CASTELO, T. S.; SILVA, A.R.. Eletroejaculação em mamíferos silvestres: principais fatores que afetam sua eficiência. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.38, n.4, p.208-213,
- CUNHA, I.C.N. Exame andrológico do cão. **J. Bras. Ciênc. Anim.** v. 1, n. 1, p. 49-65, 2008.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D. Efeito da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.1, p.104-109, 2009

GOMES-ALVES, S.; ALVARES, M.; NICOLAS, M.; et al. Salving urospermic ejaculates from brown bear (*Ursus arctos*). **Anim. Reprod. Sc.**, v. 150, p. 148-157, 2014.

GRIGGERS, S.; PACCAMONTI, D.L.; THOMPSON, R.A.; et al. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 613-622, set. 2001.

HAYASHI, K.; MORITA, R.; ASO, T.; et al. Evaluation of Transcervical Insemination using Frozen Semen by Flexible Endoscope in Dogs. **J. Vet. Med. Sc.**, v.75, n.3, p. 315-318, 2013.

HORI, T.; MATSUDA, Y.; KOBAYASHI, M.; et al. Comparison of Fertility on Intrauterine Insemination between Cryopreserved Ejaculated and Cauda Epididymal Sperm in Dogs. **J. Vet. Med. Sc.** v. 73, n.12, p.1685-1688, 2011.

LUVONI, G. C.; CHIGIONI, S.; BECCAGLIA, M. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 14, p. 286-290, 2006.

MAKLER, A.; DAVID, R.; BLUMENFELD, Z.; et al. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of urine specimens. **Fert. and Ster.** v. 4, p. 507-511, 1981.

NICOLAS, M.; ALVAREZ, M.; GOMES-ALVES, S.; et al. Effects on Brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa freezability of different extender and dilution ratios used for pre-freezing centrifugation. **Europ. J. Wild. Res.** v. 57, n. 2, p. 259-266, 2011

PAULA, T. A. R. Reprodução de carnívoros silvestres. **Rev. Bras. Rep. Anim.** v. 35, p. 103-132, 2011.

RAMOS, J.L.G. ; UZAI, G.J.S. ; SHIMODA, E. ; CUNHA, ICN. Comparação dos efeitos da contaminação do ejaculado canino com urina e incubação sob 37°C e 5°C e posterior lavagem utilizando centrifugação e filtragem. In: 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), 2017, UBERLANDIA. **Anais 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)**, Embrapa Pantanal p. 100-103, 2017.

SANTOS, I. P.; SILVA, C. M.; CARVALHO, F. P.; et al. Cooling of canine semen contaminated with urine. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 24, n. 1, p. 48-51, 2017

SANTOS, I.P.; CUNHA, I.C.N.; MELO, E.J.T. Effects of urine and NaCl solutions of different osmolarities on canine sperm. **Anim. Reprod**, v.8, n.3/4, p.73-76, 2011.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. **Ver. Port. Ciênc. Vet.**, v. 98, p. 53-60, 2003.

SOUZA, N. P.; GUIMARÃES, L.D.A.; PAZ, R.C. Dosagem hormonal e avaliação testicular em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) utilizando diferentes protocolos anestésicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 63, n. 5, p. 1224-1228, 2011.

TSAI, T.C.; LIN, M.C.; CHENG, C.J. A New Sperm Collection Method for treatment of Retrograde Ejaculation. **J. Form. Med. Assoc.**, v. 89, n. 6, p.484-486, ju. 1990.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine sêmen using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v.64, p.720–733, 2005.

WHITBREAD, T.J. The Merck Veterinary Manual. Diagnostic Procedures for the Private Practice Laboratory. Urinalysis. http://www.merckvetmanual.com/mvm/clinical_pathology_andprocedures/diagnostic_procedures_for_the_private_practice. Acess in 20 january 2018.

TRABALHO 3

Avaliação de dois métodos de descontaminação sêmen canino contaminado com urina: centrifugação e filtração

Evaluation of two methods of decontamination canine semen contaminated with urine:

Centrifugation and Filtration

J.L.G. Ramos¹, C. L. F. G. Ramos², E. Shimoda³ e I. C. N. da Cunha⁴

¹ Aluno de pós-graduação (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos dos Goytacazes – RJ

² Médica Veterinária Autônoma - Campos dos Goytacazes – RJ

³ Professor-Coordenador Mestrado Operacional – Universidade Candido Mendes - Campos dos Goytacazes – RJ

⁴ Professora - Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos dos Goytacazes – RJ

RESUMO

A contaminação do sêmen canino por urina pode se dar pela emissão de urina junto com o sêmen (urospermia), ou pela ejaculação em direção à bexiga (ejaculação retrógrada), que pode ocorrer tanto na monta natural, na coleta por estimulação peniana ou durante a eletro-ejaculação. Os efeitos que a urina causa no ejaculado, mesmo com o aumento de estudos sobre o tema, ainda não estão totalmente elucidados. Quando se trata de preservação de espécies em vias de extinção, toda amostra de material genético deve ser considerada, desta forma, tentativas de melhorar e aperfeiçoar as técnicas de coleta de sêmen podem ser aprimoradas se técnicas de “resgate” de material de baixo potencial fertilizante forem implementadas. O presente estudo teve como objetivo elaborar e avaliar dois processos de descontaminação de ejaculado contaminados por urina. O ejaculado de cães (n=10) foi incubado com urina total em duas temperaturas 37°C e 5°C por 30 minutos e após este período submetidos a dois protocolos de descontaminação: 1 – associação de centrifugação e posterior ressuspensão em dois diluidores (BotuTurbo® e formulado no laboratório); 2 – Filtração (Sperm Filter®) com ressuspensão nos mesmos dois diluidores já descrito. Após o procedimento de descontaminação as amostras mantidas incubadas em suas respectivas temperaturas (37°C e 5°C) foram avaliadas quanto à motilidade, vigor e integridade de membrana nos tempos de 0, 15, 30 e 60 minutos. Neste estudo observou-se que o uso da centrifugação ou filtração no processo de descontaminação são similares possibilitando o uso de mais uma técnica e

que o uso destas associadas aos diluidores possibilitam a redução do efeito deletério da urina e a obtenção de células viáveis para utilização em protocolos de inseminação, tendo a formulação comercial de diluidor apresentando melhores resultados.

Palavras chave: sêmen de cães, contaminação sêmen, descontaminação sêmen, reprodução.

ABSTRACT

Contamination of canine semen through urine can be by the emission of urine along with semen (urospemia), or by ejaculation towards the bladder (retrograde ejaculation), which can occur either in natural mating, collection by penile stimulation or during electrolysis -ejaculation. The effects that urine causes in ejaculate, even with the increase of studies on the subject, are not yet fully elucidated. The present study had as objective to elaborate and to evaluate two processes of decontamination of ejaculate contaminated by urine. The dog ejaculate (n = 10) was incubated with total urine at two temperatures of 37 ° C and 5 ° C for 30 minutes and after that period underwent two decontamination protocols: 1 - association of centrifugation and subsequent resuscitation in two diluents (Commercial - Botu-turbo® and formulated in the laboratory); 2 - Filtering (Sperm Filter®) with resuspion in the same two diluents already described. After the decontamination procedure, the samples kept incubated at their respective temperatures (37 ° C and 5 ° C) were evaluated for motility, vigor and membrane integrity at 0, 15, 30 and 60 minutes times. In this study it was observed that the use of centrifugation or filtration in the decontamination process are similar allowing the use of another technique and that the use of these in combination with the diluents make possible the reduction of the deleterious effect of the urine and the obtaining of viable cells for use in insemination protocols, with commercial formulation showing better results.

Keywords: semen of dogs, contamination, semen, decontamination semen , reproduction.

INTRODUÇÃO

O avanço das biotecnologias de reprodução assistida tem despertado grande interesse da comunidade científica no que concerne à preservação de espécies carnívoras ameaçadas de extinção. Desde então, o desenvolvimento de biotecnologias utilizando animais domésticos filogeneticamente próximos, como modelo experimental, tem ganhado destaque. O cão doméstico vem desempenhando importante papel, permitindo a pesquisa, o aprimoramento e a aplicabilidade dessas tecnologias às espécies silvestres ameaçadas (Luvoni, 2000; Silva *et al.*, 2003; Paula, 2011).

Cada espécie tem sua particularidade quanto à obtenção, resfriamento e congelamento de gametas; em protocolos de coleta de sêmen, o ejaculado pode ser contaminado com urina, conforme descrito em mamíferos como humanos, cavalos, raposas da floresta (*Cerdocyon thous*) e ursos pardos (Makler *et al.*, 1981; Griggers *et al.*, 2001; Souza e Paz, 2011; Gomes-Alves *et al.*, 2014). Nos canídeos é frequentemente relatada a contaminação por urina durante protocolos de eletro-ejaculação, contaminação essa provocada pela falha na sequência natural da ejaculação anterógrada (emissão seminal → fechamento da região do colo da bexiga → expulsão seminal pela uretra peniana), decorrente da falha no fechamento do colo da bexiga devido a sedação, que deve ser obrigatoriamente empregada para este procedimento em canídeos (Santos *et al.*, 2011).

Quando os espermatozóides são submetidos a um ambiente contaminado por urina, a primeira alteração a ser percebida é a redução na motilidade (Griggers *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2011) e os efeitos deletérios evidenciados relaciona-se principalmente a diferença no pH e osmolaridade (Makler *et al.*, 1981; Griggers *et al.*, 2001).

Os protocolos utilizados para evitar os efeitos da contaminação do sêmen com urina durante as coletas seminais incluem: lavagem do sêmen em meio diluidor, por meio da centrifugação, logo após a coleta (Makler *et al.*, 1981; Griggers *et al.*, 2001), uso de simpatomiméticos agonistas- α_2 para fechar o colo da bexiga no momento da ejaculação (Romagnoli, 1999) e introdução de uma quantidade de tampão dentro da bexiga suficiente para neutralizar o efeito deletério da urina sobre o sêmen (Brassesso *et al.*, 1988; Ranieri *et al.*, 1995), porém observa-se considerável variação nos resultados descritos.

Entre os métodos utilizados em protocolos de conservação de material genético por resfriamento ou congelamento de sêmen, a centrifugação é descrita como eficaz para a retirada do plasma seminal em diferentes espécies como observado em cães (Cunha e Lopes, 2009), ursos (Gomes-Alves, 2014) e bovinos (Campanholi *et al.*, 2015), porém outro método de separação proposto por Alvarenga *et al.*, (2017) é a filtração do sêmen, que foi aplicada em garanhões e já vem sendo usado em bovinos (Campanholi, *et al.*, 2015). O filtro retém apenas os espermatozoides e permite a passagem do plasma seminal, mas ainda não há relato da sua aplicação em cães.

A eletroejaculação é a técnica de eleição para obtenção de material genético dos canídeos selvagens, e conforme já citado, a contaminação dos ejaculados por urina é citada de forma recorrente quando esta técnica é empregada. Entretanto, quando se trata de preservação de espécies em vias de extinção, o aproveitamento e utilização de toda amostra de material genético deve ser considerada, sendo assim, as técnicas e protocolos de coleta de sêmen devem ser continuamente aprimorados. Propomos que, paralelamente a estes, técnicas que possibilitem o “resgate” e utilização de material genético de baixo potencial fertilizante, como o caso de sêmen de canídeos contaminado com urina, podem ser também testadas e implementadas, desta forma, objetivamos com esse trabalho: avaliar e comparar da centrifugação e filtração na descontaminação de sêmen de cão contaminado por urina.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

As amostras de ejaculados foram coletadas de 10 cães de criadores particulares: 8 Pugs, estes com peso médio de $7,4 \pm 0,2$ kg (variando de 7,2-7,8 Kg) e idade média $3,8 \pm 1,1$ anos (variando de 2 – 6 anos); 2 labradores com peso médio de $33,5 \pm 1,5$ Kg (pesos de 35 e 32 Kg) e idade média $5,5 \pm 1,5$ (idades de 4 e 7 anos)

Coleta de sêmen e urina

As amostras de sêmen foram coletadas duas vezes na semana com intervalo de 72 h, sendo utilizada apenas a segunda amostra no estudo. Esta foi obtida através de manipulação digital sem a presença de uma cadela em estro, sendo utilizado a segunda

fração dos 10 ejaculados, e as amostras tiveram início às avaliações e protocolos experimentais em laboratório não excedendo o tempo de 15 min após a coleta.

A urina autóloga foi coletada após a coleta de sêmen através da micção espontânea dos animais.

Protocolo Experimental

O Experimento foi realizado em no laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre - ES.

Após coleta, os ejaculados dos 10 cães foram divididos e incubados em urina total autóloga (solução hiperosmótica) na proporção de 1:1 durante 30 minutos nas temperaturas de 37°C (banho-maria) e 5°C (geladeira com temperatura controlada) simulando duas possibilidades de processamento *in vivo* que podem, imediatamente, suceder a coleta de sêmen de cães utilizados em protocolos de eletroejaculação nos casos em que houver exposição do sêmen a urina, bem como, formas de acondicionamento e transporte do mesmo quando em contato com esta.

Em um segundo momento após o período de incubação descrito acima cada amostra referente a sua temperatura de incubação fora submetida a dois processos de descontaminação (Figura 1):

1 – Centrifugação (800g por 5 min) e resuspensão em dois diferentes diluentes (comercial – Botu-turbo® Botupharma, – Botucatu, SP, Brasil) e formulado no laboratório (2,4 g de leite em pó, 4,9 g de glicose, 0,75 mg de sódio Bicarbonato, 20 mg de gentamicina, 1000 mL de água bidestilada, pH 6,5-7,3 e osmolaridade de 340-380 mOsm.L-1);

2 – Uso do processo de filtragem (Sperm Filter® - Botupharma – Botucatu, SP, Brasil) e resuspensão nos mesmos dois diluentes descritos acima (comercial e formulado).

Após o processo de descontaminação as amostras nos dois processos foram avaliadas nos tempos: 0, 15, 30 e 60 minutos para avaliação das variáveis: Motilidade, Vigor, Integridade de Membrana.

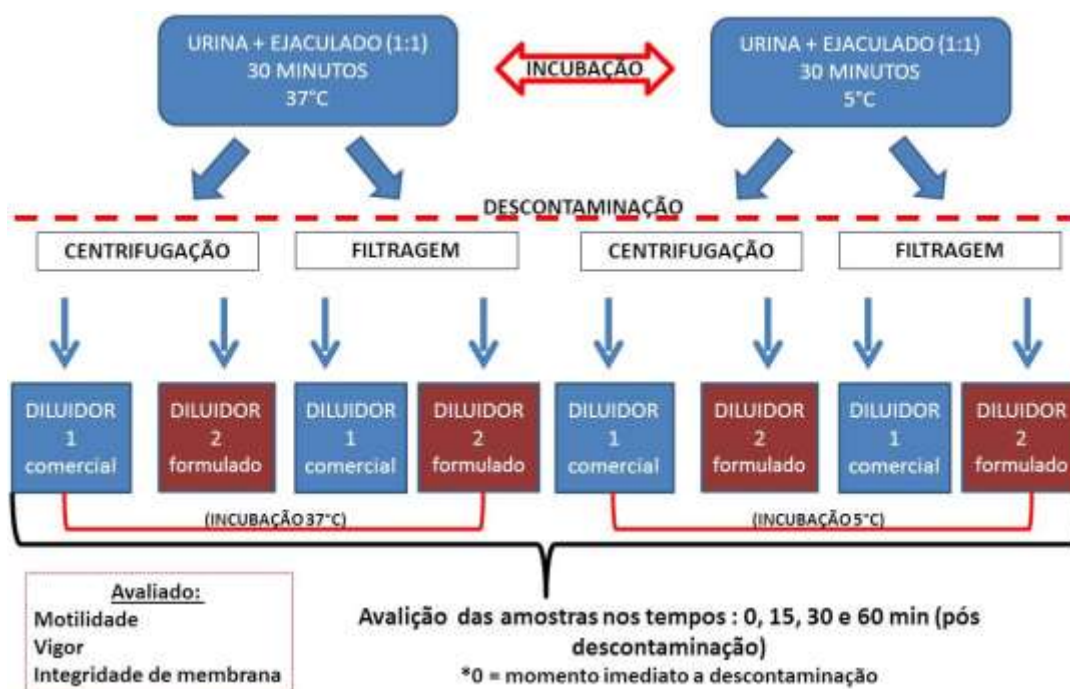


Figura 1 – Diagrama experimental: avaliação de dois processos de descontaminação ejaculado contaminado por urina

Avaliação do sêmen e da urina

O sêmen foi avaliado quanto as suas características macroscópicas: cor, aparência e volume; avaliado quanto as suas características físico-químicas como: pH utilizando-se o modelo universal de 0-14 (Phmetro de Bancada, PH 0-14 KASVI – K39-1014B); a Osmolaridade avaliada com uso do Osmômetro 5004-Micro-Osmette™ (Precision Micro Systems Inc.).

As avaliações microscópicas se fizeram com a aferição da concentração do sêmen com a diluição na proporção de 1:200 em formol salina e os espermatozoides contados em câmara de Neubauer; a análise morfológica a amostra utilizada na proporção de 1:10 e ambos procedimetos avaliados em micriscopia de contraste de fase (System Microscope Olympus Bx 41).

A motilidade e vigor foram avaliadas através do método subjetivo em microscopia de contraste de fase sendo utilizada uma alíquota de sêmen de 10µL em lâmina e lamínula aquecida a 37°C. O resultado para motilidade é expresso em porcentagem (0 – 100%) e vigor em escore (0 – 5).

A integridade e funcionalidade da membrana espermática foi avaliada através do teste hipo-osmótico (HOST) a partir de 10 µl de alíquotas de amostras incubadas

durante 10 minutos em água destilada (Solução hiposmótica). Após a incubação, 10 μ L foram retirados da amostra, colocados entre lâmina e lamínula para a avaliação da morfologia espermática em microscópio óptico com contraste de fase. Foram contados 200 espermatozóides e aqueles que estavam com a cauda enrolada forma considerados como íntegros.

As amostras de urina foram avaliadas pelo laboratório de Patologia Clínica da universidade Federal do Espírito Santo com determinação de bilirrubina, cetonas, densidade, glicose, leucócitos, nitrito, pH, proteína, sangue e urobilinogênio. A osmolaridade da urina foi avaliado por um osmômetro 5004-Micro-Osmette TM (Precision Micro Systems Inc.)

Análise Estatística

Os dados foram tabulados e organizados em planilha do Microsoft Excel e após os resultados submetidos teste t de comparação de médias e sua significância determinadas mediante utilização do aplicativo Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), versão 9.1 (2007). As diferenças estatísticas foram consideradas em $P < 0,05$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

RESULTADOS

O sêmen fresco mostrou um volume médio de $3,2 \pm 0,4$ mL, 275 ± 48 milhões de espermatozóides.mL⁻¹, $84,16 \pm 4,2\%$ de motilidade total e vigor de $4 \pm 0,5$.

Os valores dos parâmetros observados na urina dos cães não apresentaram alterações evidentes a não ser na variação da osmolaridade (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultado da análise de urina autóloga dos cães (n=10)

Variável	Resultado
Aspecto	Límpido
Cor	Amarelo-claro
Bilirrubina	normal
Cetona	normal
Densidade	1,016 ± 0,006
Glicose	normal
Leucócitos	negativo
Nitrito	normal
Osmolaridade (mOsmol.L ⁻¹)	987 a 1226 (\bar{X} = 1108±76,7)
pH	6,8 a 7,2 (\bar{X} = 7 ± 0,2)
Proteína	72 ± 12
Sangue	negativo
Urobilinogênio	normal

Após o uso das diferentes técnicas para descontaminação, após 30 minutos de exposição do sêmen a urina, a motilidade espermática (Tabela 2) manteve-se similar quando observamos o uso dos diferentes diluidores e técnicas de descontaminação ($P>0,05$), apresentando diferença estatística apenas quando observamos as avaliações nas diferentes temperaturas utilizadas ($P<0,05$).

Tabela 2 – Motilidade do sêmen canino fresco (inicial) e após descontaminação com uso de dois diluidores (comercial X Formulado), duas técnicas (Centrifugação X Filtragem) e diferentes temperaturas de incubação (37°C X 5°C).

Fator	Inicial	0	15	30	60	
Diluidor	Comercial	84,93±0,38 A	46,15±0,76 A	46,15±0,76 A	42,12±0,52 A	31,18±0,66 A
	Formulado	84,45±0,35 A	45,60±0,69 A	45,60±0,69 A	40,50±0,72 A	30,93±0,84 A
Técnica	Centrifugação	84,70±0,38 A	45,28±0,68 A	39,18±0,32 A	35,10±0,49 A	30,70±0,68 A
	Filtragem	84,68±0,35 A	44,48±0,85 A	40,32±0,67 A	36,28±0,70 A	30,40±0,58 A
Temperatura	5°C	85,35±0,34 A	47,10±0,69 A	40,20±0,49 A	35,40±0,36 A	30,30±0,73 A
	37°C	84,03±0,36 B	41,65±0,61 B	37,45±0,31 B	32,20±0,64 B	29,80±0,57 B

Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna para um dado fator não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Na observação do Vigor apesar de as amostras em seu momento inicial aparentarem diferença estatística após uso do das técnicas de descontaminação mantiveram uma similaridade não sendo observada diferença entre os fatores estudados (Tabela 3).

Tabela 3 – Vigor do espermatozoide canino fresco (inicial) e após descontaminação com uso de dois diluidores (comercial x Formulado), duas técnicas (Centrifugação x Filtragem) e diferentes temperaturas de incubação (37°C x 5°C).

Fator		Inicial	0'	15'	30'	60'
Diluidor	Comercial	4,10±0,06 A	3,20±0,04 A	3,00±0,01 A	2,8±0,05 A	2,21±0,04 A
	Formulado	3,90±0,05 B	3,10±0,04 A	3,01±0,02 A	2,7±0,03 A	2,11±0,04 A
Técnica	Centrifugação	4,09±0,04 A	3,16±0,05 A	3,05±0,04 A	2,9±0,04 A	2,16±0,05 A
	Filtragem	3,91±0,07 B	3,13±0,03 A	3,06±0,02 A	2,9±0,05 A	2,16±0,04 A
Temperatura	5°C	4,08±0,06 A	3,23±0,04 A	3,12±0,02 A	3,0±0,06 A	2,25±0,05 A
	37°C	3,93±0,05 B	3,06±0,04 A	2,90±0,09 A	2,8±0,09 A	2,08±0,03 A

Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna para um dado fator não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Para integridade da membrana se observa diferença estatística ($P < 0,05$) quando analisamos os fatores uso de diluidor e temperatura no processo de avaliação pós descontaminação (Tabela 4).

Tabela 4 – Integridade de membrana do espermatozoide canino fresco (inicial) e após descontaminação com uso de dois diluidores (comercial X Formulado), duas técnicas (Centrifugação X Filtragem) e diferentes temperaturas de incubação (37°C X 5°C).

Fator		Inicial	0'	15'	30'	60'
Diluidor	Comercial	90,00±0,29 A	63,90±0,55 A	62,90±0,45 A	58,90±0,35 A	40,63±0,69 A
	Formulado	88,90±0,40 B	61,15±0,49 B	60,05±0,59 B	54,08±0,64 B	36,93±0,69 B
Técnica	Centrifugação	89,58±0,34 A	62,63±0,54 A	60,43±0,44 A	58,22±0,30 A	39,03±0,79 A
	Filtragem	89,33±0,38 A	62,43±0,58 A	60,42±0,32 A	58,15±0,28 A	38,53±0,71 A
Temperatura	5°C	90,08±0,29 A	63,28±0,49 A	61,45±0,51 A	59,42±0,50 A	40,88±0,64 A
	37°C	88,83±0,40 B	61,78±0,60 B	59,78±0,45 B	57,25±0,39 B	36,68±0,70 B

Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna para um dado fator não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

A urina apresentou valores referenciais dentro da normalidade para um exame de urinálise (Whitbread, 2016; Santos *et al.*, 2017), entretanto a variação da osmolaridade de 987 a 1226 (média $1108 \pm 76,7$) mOsmol.L⁻¹ apresentou –se menor do que o observado por Santos *et al.* 2017, fato este talvez possivelmente relacionado pela padronização da raça e do proprietários dos animais, porém não interferindo na ação deletéria desta sobre o ejaculado, com menor osmolaridade e que apresentou variação de 257 – 287 (média 272 ± 15) mOsmol.L⁻¹.

As alterações observadas na motilidade evidenciam um decréscimo natural das amostras após descontaminação com o decorrer do tempo, seja resfriado ou aquecido, após passar por processo de centrifugação ou filtragem e também após o uso de diferentes diluidores, porém observa-se uma diferença estatística ($P < 0,05$) quando observamos a variável diluidor utilizado e a integridade de membrana, com uma melhor avaliação do diluidor comercial (BotuTurbo®), que pode ser caracterizado pela formulação do mesmo, porém em todas as avaliações, a motilidade se manteve num valor médio superior que 30% que possibilita o aproveitamento para uso em protocolos de inseminação se comparamos o que se preconiza para o uso de sêmen congelado que apresentando motilidade superior ou igual a 30% produz taxas de fertilidade de 45% no seu uso em IA com deposição vaginal e de 64 – 84 % no caso de uso em IA intra-uterina -IAIU ou IA transcervical – IAIU TC (Chirinea e Lopes 2013 e CBRA 2013).

Os efeitos deletérios da urina sobre os espermatozoides ficam mais evidentes quando este está incubado em meio aquecido, corroborando com o observado em nossos estudos anteriores (Ramos *et al.*, 2017 e Trabalho 2), evidenciando o efeito protetor do resfriamento, mesmo para incubação em ambiente adverso (hiperosmótico) provavelmente pela diminuição da atividade da célula espermática e, por consequência, do seu metabolismo e produção de catabólitos tóxicos, promovendo neste meio células espermáticas com melhores valores de motilidade e viabilidade, como já demonstrado por Vertegen *et al.*, (2005). Podemos sugerir que neste modelo de preservação e proteção aos efeitos adversos provocados pelo contato com a urina haverá uma maior probabilidade de sustentação da motilidade espermática e de capacidade de sobrevivência durante a passagem pelo trato genital da fêmea o que produzirá, por conseguinte, uma maior taxa de fertilização, concordando com o já apresentado por Das *et al.*, (2017).

Os resultados obtidos sugerem ainda que nem a centrifugação nem a filtração aumentam os efeitos negativos provocados pelo contato direto dos espermatozoides com urina, corroborando com resultados apresentados por Santos, *et al.*, (2017), e que a diluição do material descontaminado em meios extensores apropriados proporciona a manutenção da viabilidade das células espermáticas e reduz o efeito deletério da urina, mesmo tendo havido 30 minutos de contato direto dos espermatozoides com a mesma.

CONCLUSÕES

Os efeitos da centrifugação e filtração no processo de descontaminação foram similares, proporcionando mais um método alternativo e viável para processamento de amostras de ejaculados contaminados com urina.

A associação entre a utilização do diluidor BotuTurbo® para ressuspensão após descontaminação e a manutenção das amostras resfriadas (5°C) após descontaminação proporcionou os melhores resultados quanto à manutenção da qualidade de células espermáticas que estiveram por 30 minutos em contato direto com urina.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., RAMIRES NETO, C. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.41, n.1, p.81-85, jan./mar. 2017

BRASSESCO, M., VISCASILLAS, P., BURREL, L., CALAF, J., RAJMIL, O., SERRA, J.M.P., FARGAS, F.M. Sperm recuperation and cervical insemination in retrograde ejaculation. **Fertility and Sterility**, v. 5, p.923-924, 1988

CAMPANHOLI, S.P.; MONTEIRO, F.M.; DIAS, E.A.R.; MERCADANTE, M.E.Z.; PAZ, C.C.P.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA, C.P.F.; VANTINI, R.; GARCIA, J.M. Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and *in vitro* fertility. **Theriogenology**, v. 89, p. 114-121, 2015.

CBRA: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 49p

CHIRÍNEA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; TEBET, J.M.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D. características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciênc. Anim. Bras.** v. 7, n. 4, p. 407-415, 2006.

DAS, A.; BISWAS, R.K.; DEKA, B.C. EFFECT OF INCUBATION ON SPERM MOTILITY AND LIVABILITY OF LABRADOR RETRIEVER DOG SPERMATOZOA PRESERVED AT 5°C IN DIFFERENT EXTENDERS. **Ind. J. Anim. Reprod.** v.39, n.2, p. 64-66 2017.

GOMES-ALVES, S.; ALVARES, M.; NICOLAS, M.; et al. Salving urospermic ejaculates from brown bear (*Ursus arctos*). **Anim. Reprod. Sc.**, v. 150, p. 148-157, 2014.

GRIGGERS, S.; PACCAMONTI, D.L.; THOMPSON, R.A.; et al. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 613-622, set. 2001.

HAYASHI, K.; MORITA, R.; ASO, T.; et al. Evaluation of Transcervical Insemination using Frozen Semen by Flexible Endoscope in Dogs. **J. Vet. Med. Sc.** v.75, n.3, p. 315-318, 2013.

HORI, T.; MATSUDA, Y.; KOBAYASHI, M.; et al. Comparison of Fertility on Intrauterine Insemination between Cryopreserved Ejaculated and Cauda Epididymal Sperm in Dogs. **J. Vet. Med. Sc.**, v. 73, n.12, p.1685-1688, 2011.

LUVONI, G. C.; CHIGIONI, S.; BECCAGLIA, M. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 14, p. 286-290, 2006.

MAKLER, A.; DAVID, R.; BLUMENFELD, Z.; et al. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of urine specimens. **Fert. and Ster.** v. 4, p. 507-511, 1981.

PAULA, T. A. R. Reprodução de carnívoros silvestres. **Rev. Bras. Rep. Anim.** v.35, p.103-132, 2011.

RAMOS, J.L.G. ; UZAI, G.J.S. ; SHIMODA, E. ; CUNHA, I.C.N. Comparação dos efeitos da contaminação do ejaculado canino com urina e incubação sob 37°C e 5°C e posterior lavagem utilizando centrifugação e filtragem. In: 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), 2017, UBERLANDIA. **Anais 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)**, Embrapa Pantanal p. 100-103, 2017.

SANTOS, I.P.; CUNHA, I.C.N.; MELO, E.J.T. Effects of urine and NaCl solutions of different osmolarities on canine sperm. **Anim. Reprod.**, v.8, n.3/4, p.73-76, 2011.

SANTOS, I. P.; SILVA, C. M.; CARVALHO, F. P.; et al. Cooling of canine semen contaminated with urine. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 24, n. 1, p. 48-51, 2017

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. **Ver. Port. Ciênc. Vet.**, v. 98, p. 53-60, 2003.

SOUZA, N. P.; GUIMARÃES, L.D.A.; PAZ, R.C. Dosagem hormonal e avaliação testicular em cachorro-do-mato (*Cerdocyun thous*) utilizando diferentes protocolos anestésicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n. 5, p. 1224-1228, 2011.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine sêmen using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v.64, p.720–733, 2005.

WHITBREAD, T.J. The Merck Veterinary Manual. Diagnostic Procedures for the Private Practice Laboratory. Urinalysis. http://www.merckvetmanual.com/mvm/clinical_pathology_andprocedures/diagnostic_procedures_for_the_private_practice. Access in 20 january 2018

TRABALHO 4

Inseminação artificial com sêmen de cão urospérmico após descontaminação

Artificial insemination with semen urospérmico dog after decontamination

J.L.G. Ramos¹, C. L. F. G. Ramos², E. Shimoda³ e I. C. N. da Cunha⁴

¹ Aluno de pós-graduação (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos dos Goytacazes – RJ

² Médica Veterinária Autônoma - Campos dos Goytacazes – RJ

³ Professor-Coordenador Mestrado Operacional – Universidade Candido Mendes - Campos dos Goytacazes – RJ

⁴ Professora - Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos dos Goytacazes – RJ

RESUMO

Este trabalho relata o uso de um protocolo de acondicionamento, manutenção e descontaminação de sêmen canino contaminado por urina (urospérmico) e o uso deste em protocolo de inseminação artificial intra-vaginal (IA) de duas cadelas. Após realização de exame andrológico do cão (CBRA, 2013) e constatado contaminação de urina em seu ejaculado anterógrado, havendo interesse de utilização deste material para a reprodução, iniciou-se o acompanhamento do ciclo estral de duas fêmeas adultas e saudáveis da mesma raça por meio de citologia vaginal. A colheita de sêmen foi realizada por estímulo manual do pênis e o ejaculado submetido ao armazenamento imediato a temperatura de 5°C, diluído na proporção de 1:1 com diluidor o comercial BotuTurbo®. Foi realizada filtragem do material para descontaminação através do filtro SpermFilter® de onde obteve-se uma amostra seminal com características e qualidade passível de uso em protocolos de IA (motilidade média de 56 % , vigor de 3% e concentração média de 177 espermatozóides.mL-1). Realizou-se três IAs em cada fêmea, sempre sendo realizado o mesmo protocolo com a amostra seminal obtida, com intervalo de 48 h entre cada IA. O diagnóstico de gestação foi realizado após 30 dias da identificação do diestro citológico, sendo positivo para as duas fêmeas inseminadas, produzindo quatro e três filhotes em cada parto. Concluímos que o processo de descontaminação utilizado possibilitou a manutenção e obtenção de células espermáticas viáveis e aptas para fertilizar um oócito e promover uma gestação.

Palavras chave: IA, fertilização, descontaminação seminal, filtração ejaculado

ABSTRACT

This work reports the use of a protocol for the conditioning, maintenance and decontamination of canine semen contaminated by urine (urospermic) and its use in the intra-vaginal artificial insemination protocol (AI) of two bitches. After an andrological examination of the dog (CBRA, 2013) and urine contamination was verified in its antegrade ejaculate, and there was an interest in the use of this material for breeding, it was followed the estral cycle of two healthy adult females of the same breed by vaginal cytology. Semen collection was performed by manual penis stimulation and the ejaculate was submitted to immediate storage at 5 ° C, diluted 1: 1 with BotuTurbo® commercial diluent. Filtration of the decontamination material through the SpermFilter® filter was performed, from which a seminal sample was obtained with characteristics and quality that could be used in AI protocols (mean motility of 56%, vigor of 3% and average concentration of 177 spermatozoa.mL⁻¹). Three AIs were performed in each female, always being the same protocol with the seminal sample obtained, with interval of 48 h between each AI. The gestation diagnosis was performed after 30 days of identification of the cytological diestrus, being positive for the two inseminated females, producing four and three pups at each birth. We conclude that the decontamination process allowed the maintenance and obtaining of viable sperm cells and able to fertilize an oocyte and promote a pregnancy.

Key words: AI, fertilization, seminal decontamination, ejaculate filtration

INTRODUÇÃO

Com proximidade e interação cão-homem, houve um aumento do interesse por parte dos criadores em incrementar a eficiência reprodutiva de seus animais, levando dessa forma a uma maior utilização de biotécnicas da reprodução aplicadas aos cães, atentando para a preservação e multiplicação de algumas raças de alto valor zootécnico (Evangelista *et al.*, 2016).

A inseminação artificial (IA) pode ser utilizada na espécie canina como alternativa para animais impossibilitados de realizarem a monta natural quer seja por anomalias anatômicas, problemas comportamento, distâncias geográficas que dificultem

a viagem dos animais ou na utilização de amostra de material genético com baixo potencial fertilizante. A IA é preconizada ainda por proteger animais de contaminações por doenças sexualmente transmissíveis, agressividade inerente da raça, bem como, desproporção em relação ao peso entre o casal (Uchoa *et al.*, 2012).

Cada espécie tem sua particularidade quanto à obtenção, resfriamento e congelamento de gametas. Nos canídeos é relatada a contaminação por urina, seja pela emissão de urina junto com o sêmen (urospermia), ou pela ejaculação em direção a bexiga (ejaculação retrógrada), que pode ocorrer tanto na monta natural, como na coleta por estimulação peniana ou durante a eletro-ejaculação (Santos *et al.*, 2011). A contaminação é provocada devido a falha na sequência natural da ejaculação anterógrada com eventual falha no fechamento do colo da bexiga.

Quando os espermatozóides são submetidos a um ambiente contaminado por urina, a primeira alteração a ser percebida é a redução na motilidade (Griggers, *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2011). Os protocolos utilizados para evitar os efeitos da contaminação do sêmen com urina durante as coletas incluem: lavagem do sêmen em meio diluidor por meio da centrifugação logo após a coleta (Makler *et al.*, 1981; Griggers *et al.*, 2001), uso de simpatomiméticos agonistas- α_2 para fechar o colo da bexiga no momento da ejaculação (Romagnoli, 1999) e introdução de uma quantidade de tampão dentro da bexiga suficiente para neutralizar o efeito deletério da urina sobre o sêmen (Brassesso *et al.*, 1988; Ranieri *et al.*, 1995) porém, com considerável variação nos resultados.

Em estudos recentes apresentamos uma metodologia de armazenamento (5°C) e descontaminação (filtragem) de sêmen de cão contaminado com urina que, mesmo após o contato com esta por até 30 minutos, possibilitou a obtenção de células espermáticas viáveis (Trabalho 2 e 3).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho é relatar o uso de sêmen de um cão macho urospérmico, adulto e saudável da raça Pug após processo de descontaminação pela urina, para a inseminação artificial intra-vaginal em duas cadelas da mesma raça.

DESCRIÇÃO DO CASO

Um proprietário de um Canil de Pugs Localizado na Cidade de Gerônimo Monteiro –ES procurou atendimento veterinário em novembro de 2016 para um cão macho da raça Pug pesando 7,4 kg e com 3,5 anos de idade, com histórico de tentativas sucessivas frustradas de emprenhar fêmeas pela de monta natural. Foram feitas tentativas de cópula com 4 fêmeas diferentes, sem sucesso na obtenção de prenhez.

Não foi observada nenhuma alteração na avaliação clínica, e o animal apresentava mucosas normocoradas, linfonodos normais e temperatura de 38,5 °C. Exames laboratoriais como hemograma completo não apresentaram qualquer tipo de alteração.

Ao realizar ao exame andrológico em 18-11-2016 foi observada a presença dos dois testículos com consistência e tamanhos normais; após coleta do ejaculado através de manipulação digital observou-se: Avaliação macroscópicas – volume total de 4,6 ml, cor amarelada e aspecto leitoso; Avaliação microscópica 15 minutos após coleta: Motilidade (45%), vigor (3), Integridade de Membrana (62,4 %) e morfologia normal (88,32 %).

Em uma segunda coleta seminal, em 09-12-2016, observou-se: Avaliação macroscópicas – volume total de 4,8 ml, cor amarelada e aspecto leitoso; Avaliação microscópica 15 minutos após coleta: Motilidade (40%), vigor (3), Integridade de Membrana (60,2 %) e morfologia normal (89,4 %).

Ambos os resultados (tabela 1) são condizentes com o observado por Ramos *et al.* (2017) em estudo com sêmen de cães contaminados com urina, sendo assim, diagnosticou-se o animal como urospérmico e devido o interesse da proprietária em promover a reprodução do mesmo, foi apresentado a esta o estudo desenvolvido com descontaminação de sêmen canino com uso da filtragem associada à incubação em temperatura de 5°C e uso do diluidor BotuTurbo.

Tabela 1 – Valores dos parâmetros observados em exame andrológico de cão comparado com resultado de trabalho de avaliação de sêmen cão contaminado com urina

	Coleta 1	Coleta 2	Ramos et al 2017 (15 min - 3°C)
Volume (mL)	4,6	4,8	
Motilidade (%)	45	40	48,3 ± 9
Vigor	3	3	2,8 ± 0,5
Morfologia (%)	88,32	89,4	91,5 ± 8
Integridade de Membrana (%)	62,4	60,2	80,1 ± 5

Foram selecionadas duas cadelas de raça Pug do mesmo canil para acompanhamento do ciclo estral por meio de citologia vaginal para realização de IA no momento do estro utilizando-se o sêmen do cão urospérmico após processo de descontaminação da amostra.

Em 5 de dezembro de 2016 as duas cadelas apresentaram os sinais de proestro (secreção serosanguinolenta, inquietação, aumento de vulva, machos sendo atraído porém sem deixar se montar) e foi iniciado o acompanhamento de seus ciclos estrais por meio de citologias vaginais (tabela 2).

Tabela 2 – Avaliação citológica de duas fêmeas da raça Pug no período de 05-01-2017 a 19-01-2017 para realização de inseminação artificial intravaginal (IAIV).

	(%) células superficiais na citologia vaginal	
DATA	Animal 1	Animal 2
05-01	30	40
07-01	35	45
09-01	60	65
11-01	80 (1 ^a - IA IV)	85 (1 ^a - IA IV)
13-01	90 (2 ^a - IA IV)	90 (2 ^a - IA IV)
15-01	90 (3 ^a - IA IV)	90 (3 ^a - IA IV)
17-01	85	80
19-01	< 40 (Diestro)	70
21 -01	---	<40 (Diestro)

*IA IV – inseminação artificial intravaginal

O ejaculado do macho urospérmico foi coletado nos dia em que a citologia apresentou-se com porcentagem de células superficiais superior a 80% e foi processado de acordo com o proposto em estudo anterior.

Após colheita o ejaculado foi imediatamente acondicionado em recipiente com temperatura controlada a 5°C e diluído na proporção de 1:1 com diluidor BotuTubo®, num intervalo não superior a 20 minutos este ejaculado foi transportado até o laboratório e passou por processo de filtração através de filtro SpermFilter®. A amostra filtrada foi ressuspendidas e usadas para IAIV com o volume dividido por dois formando assim a dose inseminante de cada animal (Figura 1), todos os ejaculados passaram por avaliação antes e após filtração (Tabela 3).

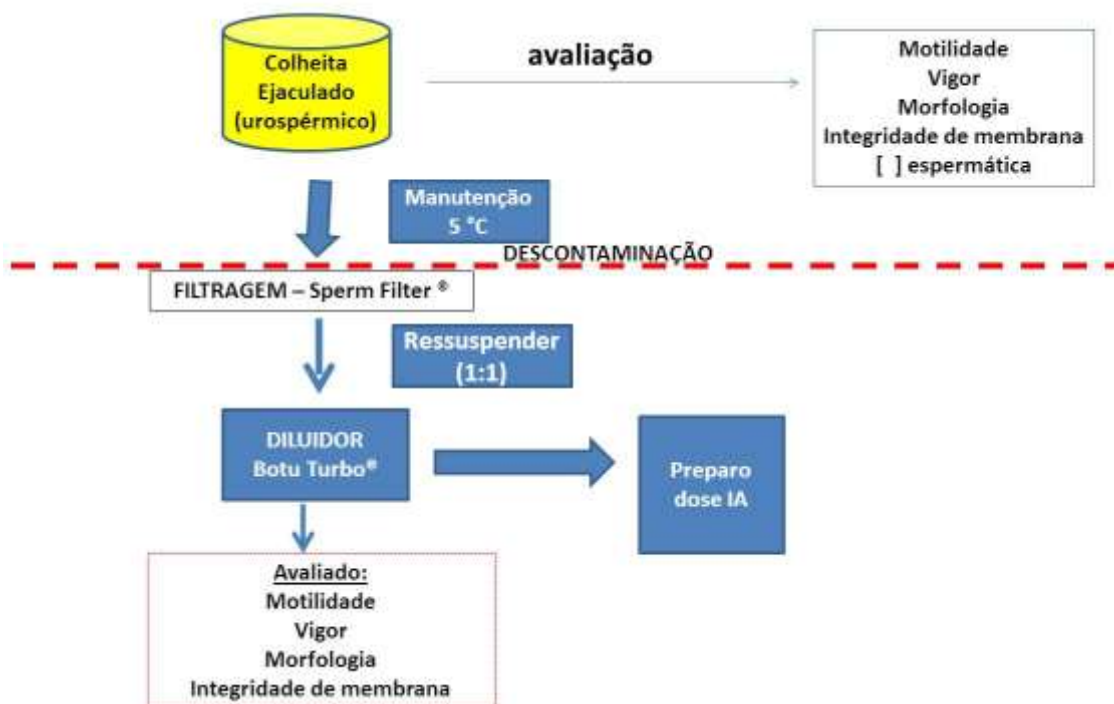


Figura 1 – Diagrama experimental: Aplicação de protocolo de descontaminação de ejaculado urospérmico de cão com uso de filtração.

Tabela 3 – Avaliação de ejaculado de cão urospermico nos momentos Pós-colheita e Pós-descontaminação para uso em protocolo de Inseminação Artificial Intravaginal.

	Pós-colheita	Pós-filtragem	Pós-colheita	Pós-filtragem	Pós-colheita	Pós-filtragem	Pós-colheita	Pós-filtragem
	1ª IA		2ª IA		3ª IA		Média	
Volume (mL)	4,2	8,0	4,0	8,0	3,5	7,0	3,9	7,67
Motilidade (%)	45	55	50	58	40	55	45	56
Vigor	3	3	3	3	3	3	3	3
Morfologia	87,25	90,20	89,45	90,8	87,25	90,20	87,98	90,40
Integridade de Membrana [] espermática	65,40	68,20	68,30	70,40	64,20	66,70	65,96	68,43
(espermatozóides.mL ⁻¹)	270	186	254	178	262	167	262	177

As IAs foram realizadas através de pipeta plástica própria para inseminação na espécie canina, com a deposição da dose inseminante ($x = 3,8$ ml) no fundo vaginal de cada uma das fêmeas, consecutivamente. Após a deposição do sêmen as cadelas foram mantidas por 10 minutos com os membros posteriores elevados com objetivo de evitar o refluxo de conteúdo.

Por volta de 30 dias após o diestro citológico, foi realizado exame ultrassonográfico abdominal nas cadelas para diagnóstico de gestação (20-02-2017 e 22-02-2017) e confirmada a presença de fetos vivos e viáveis em ambos os animais inseminadas. Em 23 de março de 2017, após realização de novo exame ultrassonográfico e observação de aparente início de sofrimento fetal na gestação da cadela 1 (Batimentos cardíacos fetais < 190 Bat.min⁻¹), foi realizada cesariana na cadela e o nascimento de quatro filhotes (3 fêmeas e 1 macho). Em 24 de março o mesmo foi observado na cadela 2 (Batimentos cardíacos fetais < 185 Bat.min⁻¹) e foi realizada cesariana que produziu nascimento de três filhotes vivos e viáveis (2 fêmeas e 1 Macho) (Tabela 4).

Tabela 4 – Diagnóstico de gestação, data do parto e número de filhotes de cadelas após IAIV com sêmen de cão urospermico descontaminado.

Atividade	Animal 1	Animal 2
Diagnóstica gestação	20-02-2017 → +	22-02-2017 → +
Parto (Cesária)	23-03-2017	24-03-2017
Numero filhotes	4 (3 f e 1 m)	3 (2 f e 1 m)

+ = Gestação positiva, f = Fêmeas e m = Machos

DISCUSSÃO

O cão do caso relatado apresenta como característica a urospermia que pode ocorrer em animais devido à falha no mecanismo de ejaculação promovendo falha no fechamento do colo da bexiga e assim permitindo a emissão de urina junto com o ejaculado, a presença desta em contato com células espermáticas já foram objetos de estudos onde se demonstrou que a hiperosmolaridade da mesma interfere diretamente na qualidade espermática alterando principalmente a motilidade da mesma demonstrado o efeito deletério da urina (Griggers *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2011), bem como, este efeito é progressivo no decorrer do tempo e sendo o período de no máximo 30 minutos possíveis para que se faça a descontaminação e obtenha células espermáticas viáveis (Ramos *et al.*, 2017).

O uso de metodologias que possibilitem o aproveitamento do ejaculado tem sua importância tanto para atender a o mercado pet onde hoje temos a cada dia mais uma inter-relação homem – animal tanto afetivamente como comercialmente, levando a busca e estudos para uso de biotécnicas objetivando a reprodução de raças de valor zootécnico, bem como, serve como modelo experimental para usar em animais carnívoros ameaçados de extinção tendo em vista que no processamento de material genético de animais em via de extinção, toda amostra colhida deve ser aproveitada.

O uso de uma metodologia estudada por nossa equipe, onde a manutenção deste ejaculado contaminado em ambiente refrigerado e posterior filtração do mesmo com adição de diluente comercial possibilitou a obtenção de células espermáticas viáveis e com características satisfatórias para serem utilizadas em inseminação artificial mesmo que vaginal. A motilidade espermática média foi 56 %, o vigor médio de 3% e concentração espermática média foi 177 espermatozoides.mL⁻¹, corroborando com o observado em Ramos *et al* 2017, Santos *et al.*, 2017. Os parâmetros seminais observados está em acordo com o preconizado pelo CBRA (2013) para uso de sêmen resfriado, que é a motilidade superior ou igual a 50%, vigor maior ou igual a 3, dose

inseminante de $150 \times 10^6/\text{mL}$ ou sêmen congelado congelado com deposição vaginal que é motilidade superior ou igual a 30% , vigor maior ou igual a 3, dose inseminante de $30 - 50 \times 10^6/\text{mL}$ e que segundo a literatura possibilitam uma fertilidade com a IAIV de, respectivamente, de 80 a 90 % e de 45% (Chirinea e Lopes 2013 e CBRA 2013).

Neste relato foi realizado o acompanhamento do ciclo estral da cadela através da observação das mudanças comportamentais e da citologia vaginal, no entanto estes métodos, apesar de bastante uteis e rotineiramente utilizados na clínica reprodutiva, não permitem determinar o dia exato da ovulação (Gonsalves e Figueiredo, 2003). Entretanto, este foi o método possível de ser utilizado na região e nas condições em que nos encontrávamos para uma melhor resposta e resultado em estudos futuros e em caso de animais ameaçados de extinção o uso da dosagem hormonal de progesterona para detecção do melhor momento para a realização da IA deve ser preconizada (Reynaud *et al.*, 2005 e Lopes e Derussi, 2009).

O método de IA utilizado foi a deposição vaginal por ser o método disponível no momento e apresentar-se como uma via de fácil e com resultados satisfatórios no uso de sêmen fresco e refrigerado (Uchoa, 2012), porém apesar de o ejaculado após descontaminação apresentar características satisfatórias para uso nesta via, devemos pesar que o uso de uma via intrauterina possibilita uma maior chance de sucesso, e ainda que, considerando-se o emprego desta metodologia em animais ameaçados de extinção, esta seria a via de escolha pelo fato da necessidade de captura e sedação do animal para a realização do procedimento.

CONCLUSÃO

O ejaculado de cão contaminado com urina, imediatamente diluído em meio comercial, resfriado a 5°C por período inferior a 20 min, descontaminado através da filtragem e usado para inseminação artificial com deposição intravaginal produz gestação e obtenção de fetos vivos e viáveis.

REFERÊNCIAS

- BRASSESCO, M., VISCASILLAS, P., BURREL, L., CALAF, J., RAJMIL, O., SERRA, J.M.P., FARGAS, F.M. Sperm recuperation and cervical insemination in retrograde ejaculation. **Fert. and Ster.**, v. 5,p.923-924,1988.
- CBRA: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 49p
- CHIRÍNEA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; TEBET, J.M.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D. características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 7, n. 4, p. 407-415, 2006.
- Derussi, A.A.P.; Lopes, M.D. Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.33, n.4, p.231-237, 2009.
- Evangelista, L.S.M.; Filho, M.A.C.S.; Souza, J. A.T. Inseminação Artificial Intravaginal em cadela da raça Dogo Argentino utilizando sêmen refrigerado: Relato de caso. **PUBVET** v.10, n.3,p.244-247,2016.
- FUTINO, D.O.; MENDES, M.C.B.; MATOS, M.N.L.; et al. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. **Reprod. Dom. Anim.**, v.45, p.214-220, 2010
- GONSALVES, O. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; V. J. F. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal** . São Paulo: Varela, 2003. 340p.
- GRIGGERS, S.; PACCAMONTI, D.L.; THOMPSON, R.A.; et al. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 613-622, set. 2001.
- MADEIRA, V.L.H.; MONTEIRO, C.L.B.; BARBOSA, C.C.; et al. Efeito de diferentes protocolos de descongelação sobre o sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco em pó (ACP®). **Ciênc. Anim. Bras.** v.11, p.845-852, 2010.
- MAKLER, A.; DAVID, R.; BLUMENFELD, Z.; et al. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of urine specimens. **Fert. and Ster.** v. 4, p. 507-511, 1981.
- MAKLOSKI, C. L. Clinical Techniques of Artificial Insemination in Dogs. **Vet Clin Small Anim.** V.42, p. 439-444, 2012.
- RAMOS, J.L.G. ; UZAI, G.J.S. ; SHIMODA, E. ; CUNHA, ICN. Comparação dos efeitos da contaminação do ejaculado canino com urina e incubação sob 37°C e 5°C e posterior lavagem utilizando centrifugação e filtragem. In: 2ª Reunião da Associação

Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), 2017, UBERLANDIA. **Anais 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)**, Embrapa Pantanal p. 100-103, 2017.

REYNAUD K, FONTBONNE A, MARSELOO N, THOUMIRE S, CHEBROUT M, VIARIS DE LESEGNO C, CHASTANT-MAILLARD S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, v.130, p.193-201, 2005.

ROMAGNOLI, S. Retrograde ejaculation in the dog. **WSAVA CONGRESS**. 1999.

SANTOS, I.P.; CUNHA, I.C.N.; MELO, E.J.T. Effects of urine and NaCl solutions of different osmolarities on canine sperm. **Anim. Reprod**, v.8, n.3/4, p.73-76, 2011.

UCHOA , D. C.; SILVA, T. F. P.; MOTA FILHO, A. C.; SILVA, L. D. M. Criopreservação de sêmen e Inseminação Artificial em cães. **Ciênc. Anim.**, V.22, p132-142, 2012.

WITTAYARAT, M.; KIMURA, T.; KODAMA, R.; et al. Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin c in combination with green tea polyphenol. **Cryo Lett**, v.33, p.318-326, 2012.

7 – CONCLUSÕES GERAIS

O Tema estudado (Sêmen de Cães) apresenta importante grau de relevância e tem atraído a atenção para publicação internacional e nacional no período estudado (2005-2014), como o Brasil figura entre os principais em produção científica sobre o tema sendo evidenciado observação de uma maior taxa de crescimento nas publicações, influência de nossos autores e instituições presentes entre os que mais publicam.

Após observação da importância do tema estudado desenvolvemos trabalhos que evidenciaram que o tempo máximo para ação de descontaminação de um sêmen contaminado com urina deve ser de 30 minutos e a manutenção deste em ambiente refrigerado proporciona melhores resultados quanto a sua motilidade e viabilidade em comparação a manutenção em meio aquecido.

O trabalho também conseguiu propor a filtragem (Sperm Filter®) como uma alternativa viável e eficiente para descontaminação de sêmen contaminados com urina e obtenção de células espermáticas viáveis, sendo comprovado através da aplicação da técnica associada ao uso do resfriamento (5°C) e diluição em diluidor comercial (Botu Turbo®) em um protocolo de inseminação artificial intravaginal em cão urospérmico, promovendo a fertilização e por consequência a gestação em duas cadelas.

São necessários mais estudos sobre o tema para maiores esclarecimentos sobre a ação deletéria da urina e o mecanismo de proteção promovido a células espermáticas em ambiente refrigerado, bem como, confirmar as taxas de fecundação com o uso de ejaculados submetidos a esses processos de descontaminação.