

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**AMANDA DE ASCENÇÃO ROCHA**

**FERTILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO SÊMEN CANINO REFRIGERADO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ**

**Dezembro - 2011**

**AMANDA DE ASCENÇÃO ROCHA**

**FERTILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO SÊMEN CANINO REFRIGERADO**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Isabel Candia Nunes da Cunha

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

Dezembro - 2011

## *Dedico...*

*À minha mãe Ana Maria,*

*ao meu pai Carlos Roberto,*

*e meu irmão Alexandre,*

*Dedico à vocês este trabalho, por todo suporte, por toda base.*

*Por permitirem aprender com vocês, o que é ser alguém de bem,*

*por saber ser justa, ser honesta, ser simples.*

*Por tantas vezes abrirem mão dos seus ideais em função dos meus,*

*e por sempre terem acreditado nos meus sonhos e objetivos.*

*Dedico pelo fato, de que minha vida não seria possível*

*sem a simples presença de vocês.*

## *Especialmente...*

*Ao querido André Luiz,*

*pela companhia, pelo respeito e amor mútuos. Por me ensinar nos últimos anos que a vida pode ser muito mais simples do que complicada, muito mais brincalhona do que séria, muito mais colorida do que preta e branca.*

*Por mostrar como devemos agradecer por estarmos vivos todos os dias, como devemos aproveitar nosso dia como se fosse o último. Independente do que nos aconteça amanhã, o hoje é muito importante e o ontem já passou.*

*Você me mostrou como entender cada um dos meus dias de uma forma mais leve, mais calma, mais simples...*

*Hoje sei que não precisamos ser muito inteligentes ou especialistas em diversas áreas para entender a vida dessa forma, imagino de coração que podemos aprender tudo isso de uma forma muito simples... através da amizade e do amor ...*

*Independente do que aconteça daqui pra frente, tenhamos a certeza de que até agora, vivi os dias mais felizes da minha vida ao seu lado...*

## AOS ANIMAIS...

*A todos os cães utilizados nos experimentos, obrigada pela dedicação, por permitirem serem "usados" em função deste estudo. Por serem doces, e transmitirem tanta paz.*

*Sem cada um de vocês nada disso seria possível.*

*Meu imenso respeito e admiração. Minha eterna gratidão.*

*A cada um dos meus filhos de patas e pelos, que por vezes também foram foco do meu estudo, a única coisa que poderia fazer neste momento, era agradecer e me desculpar.*

*Pedir desculpas, por tantas vezes não ter o tempo suficiente e merecido para dar todo carinho e atenção, pelas vezes que o cansaço e stress fizeram com que eu fosse injusta e rude com vocês. E agradecer por cada momento, por cada pulo, cada arranhão e cada lambida, vê-los hoje correndo na grama de casa, só me faz ter certeza que não existiria escolha mais correta para minha vida. Sintam-se agora agarrados e beijados... Zurg, Luninha, Maouí, Janah, Dark, Canjícão, Paçoca, July, Selene, Íris, Tehuca e Sarninha.*

*Uma homenagem muito especial, aos meus filhos que por motivos maiores, Deus achou melhor que nos deixassem, cada vez que um de vocês se vai, um pedaço do meu coração vai com vocês, cada vez que lembro de cada um de vocês, lágrimas de uma saudade muito boa escorrem pelo meu rosto.... muito obrigada por terem me ensinado a amar incondicionalmente nosso semelhante. Fiquem com Deus, estejam em paz... Cherrye,*

*Shade, Cacauzinha, Flora e Horácio.*

## Agradecimentos....

A vida às vezes nos 'prega algumas peças'. Faz com que passemos por momentos que jamais desejamos, e por isso faz com que possamos perceber que todas essas 'peças' se encaixam... Encontros não acontecem por acaso, e acasos jamais vão existir...

Por vezes sem querer, uma dor imensa nos atinge, dor que parece não ter fim, não ter sentido, não ter motivo. E não tem! Essas 'peças que a vida nos prega', nos arranca precocemente pessoas que nem nós mesmos sabíamos que amávamos tanto, pessoas que não sabíamos o quanto eram importantes, o quanto a simples presença nos fazia bem, nos fazia mais felizes, nos fazia melhores...

Por mais que pareçam malvadas, essas 'peças que a vida nos prega' acabam se encaixando. E quando elas se encaixam, como num grande quebra-cabeça, percebemos que havia um sentido para tudo acontecer... Às vezes muito simples, às vezes de uma grandeza imensurável.

Algumas vezes pessoas cortam o nosso caminho por um período de tempo muito rápido, muito mais curto do que queríamos, e de uma forma indescritível marcam nossa existência para sempre, farão com que lembremos delas eternamente... E nessa lembrança por vezes triste, por vezes feliz, percebemos como devemos ser melhores, mais amigos, mais cúmplices... Como devemos valorizar coisas muito mais simples, momentos bobos, mas que se tornam especiais, essenciais...

Essas 'peças que a vida nos prega' devem ter um grande motivo, nem que seja ter te conhecido, nem que seja ter guardado pra sempre em nossa lembrança o teu sorriso, nem que seja ter te levado pra sempre dentro de nós...

esteja em paz amigo, por que a saudade aqui é muito grande, mas a sua amizade (apesar de rápida) foi bem maior... Você conseguiu nos mostrar qual é o verdadeiro sentido da palavra "amigo"... Esteja em paz...

Agradeço primeiramente a Deus, pela possibilidade de estar viva, de realizar este estudo e principalmente por ter colocado em meu caminho pessoas tão importantes. Aos **meus pais, irmão, cunhada e lindos sobrinhos**, pela presença mesmo com a distância, pelo amor e admiração não mesmo recíprocos, e por tornarem minhas idas ao Rio tão menos cansativas e mais recompensantes.

**André**, por todo incentivo e dedicação, por todo amor e respeito, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis durante a pós-graduação. Pela ajuda, indispensável, em todo o longo experimento. Por suportar o cansaço em todas as cesáreas de madrugada, os proprietários nem sempre tão receptivos à realização de coletas de dados e exames, as noites em claro em função das ninhadas frutos deste estudo. Com certeza, este trabalho teria sido bem mais difícil sem a sua presença.

A professora e orientadora **Isabel Candia**, pelos constantes ensinamentos na clínica reprodutiva de pequenos animais e por permitir a execução do estudo nesta linha de pesquisa.

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciência Animal, por momentos agradáveis dentro do hospital Veterinário, e por outros nem tão agradáveis assim. Mesmo que momentaneamente possamos nos sentir prejudicados ou injustiçados, de tudo sempre se tira uma lição, sempre se aprende um pouco mais. Em especial à professora **Fernanda Antunes**, pela amizade, respeito, compreensão e por estar SEMPRE disposta a ajudar, independente do dia, da hora e da situação (seja ela acadêmica ou não). E claro, pela gargalhada mais contagiante que eu poderia ter conhecido...

À todos os amigos e colegas, integrantes ou não da pós graduação, pelo companheirismo, pelas conversas de corredor, pelas brincadeira com meu imenso nervosismo durante as cirurgias, pelas noites de *LordPub*, festinhas, churrascos, congressos e shows... se vivêssemos em função do estudo e dos experimentos com certeza não seríamos tão felizes.

Vocês são o motivo da realização deste trabalho, pelo qual eu dediquei tantos anos da minha vida. Razão pelo qual continuo trabalhando e me dedicando. Sem cada um de vocês nada disso seria possível. Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Amanda de Ascensão Rocha, nasceu no Rio de Janeiro em 20 de junho de 2011. Em 1998, ingressou no curso de medicina veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense, graduando-se em janeiro de 2003. Em seqüência, iniciou o curso de mestrado em Produção Animal na mesma instituição, submetendo-se a defesa de tese em maio de 2005. Coursou a especialização em Nutrição em Clínica de Cães e Gatos, na Universidade Federal de Lavras, apresentando o trabalho de conclusão de curso em julho de 2006. Aprovada na seleção de pós graduação no primeiro semestre de 2007, conclui do curso de doutorado em Ciência Animal na Universidade Estadual do Norte Fluminense.

## RESUMO

Rocha, Amanda de Ascensão, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense; dezembro de 2011; **FERTILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO SEMEN CANINO REFRIGERADO**. Orientadora profa. Isabel Candia Nunes da Cunha.

A inseminação artificial em cães além de fazer parte da rotina da clínica médica de pequenos animais, atualmente é o teste mais confiável ao se comparar os métodos de manipulação e preservação de sêmen. Os testes de fertilidade *in vivo* são difíceis de serem realizados em canídeos domésticos, devido a necessidade de gestações positivas para provar uma característica seminal, a longa duração do ciclo estral das cadelas e a baixa eficiência dos protocolos de indução e sincronização de estro nesta espécie. Por este motivo, cada vez objetiva-se em estudar os testes *in vitro* para avaliação da qualidade da amostra seminal, seja ela fresca, refrigerada ou congelada. As avaliações espermáticas incluem principalmente avaliação da motilidade e vigor espermático, integridade de membrana, integridade acrossomal, morfologia, qualidade do DNA celular e capacidade ligante e de fecundação oocitária. A cinofilia atual tem objetivos comerciais que envolvem grandes investimentos econômicos, por parte de criadores de raças específicas. Comumente o médico veterinário é procurado com o intuito de permitir que amostras seminais sejam deslocadas para diferentes cidades e países buscando a inseminação artificial de fêmeas em grandes distâncias geográficas. A idéia da refrigeração é a manutenção da célula espermática viável por 24 a 96 horas, permitindo a utilização desse sêmen para processos de inseminação, sem necessariamente a presença do macho reprodutor. Este estudo objetivou em avaliar a qualidade seminal ao longo de três diferentes períodos de refrigeração, verificando o índice gestacional bem como a influência desses períodos de refrigeração nos padrões *in vitro* (motilidade, vigor, funcionalidade de membrana e interação entre espermatozóides e oócito). Dividido em 3 blocos experimentais de avaliação, 48 cadelas foram inseminadas

com sêmen coletados de cães das mesmas raças. As amostras seminais utilizadas para inseminação foram divididas em 4 diferentes processamentos, sendo eles sêmen fresco (GC), ou refrigerado por 24 horas (G24), 48 horas (G48) e 72 horas (G72). No momento da inseminação artificial, as amostras foram avaliadas em cada um dos testes *in vitro* citados anteriormente. Buscando avaliar os efeitos do processo de refrigeração seminal nos parâmetros *in vitro* verificou-se que ao longo do processo de refrigeração a qualidade seminal decresce gradativamente, apresentando resultados das avaliações *in vitro*, inferiores nas amostras refrigeradas em relação ao grupo controle (sem refrigeração). Entre si, em cada grupo refrigerado por diferentes períodos, quanto maior o tempo de exposição da amostra à baixas temperaturas, pior os índices de avaliação das amostras. Em relação ao índice gestacional, verifica-se resultado semelhante, com o processo de refrigeração o número de cadelas gestantes é menor, partindo de valores de 100% de gestação positiva com sêmen fresco e em 24 horas de refrigeração, até 83% de positividade em amostras refrigeradas por 48 horas, até o índice nulo de gestações com as amostras refrigeradas por 72 horas. Buscando comparar testes *in vitro* com resultados *in vivo* (gestações positivas) verifica-se alta correlação entre cada um dos parâmetros avaliados laboratorialmente com o número de gestações da mesma amostra utilizada para inseminação artificial. Novamente observa-se que com o processo de refrigeração as avaliações *in vitro* decrescem de qualidade e conseqüentemente o número de fêmeas gestantes também apresenta-se menor. Os dados deste estudo permitem concluir que o processo de refrigeração reduz significativamente a qualidade seminal analisada laboratorialmente, bem como o índice de gestação das fêmeas inseminadas. Além disso, na espécie canina as avaliações de motilidade e vigor espermático, teste de funcionalidade de membrana e teste de ligação oocitária são avaliações fieis e com grande capacidade de predizer a qualidade fecundante de uma amostra seminal.

Palavras – chave: sêmen, refrigeração, inseminação artificial

## ABSTRACT

Rocha, Amanda de Ascensão, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense; dezembro de 2011; **IN VITRO AND IN VIVO FERTILITY OF CHILLED CANINE SEMEN**. Orientadora profa. Isabel Candia Nunes da Cunha

Artificial insemination in dogs (*canis familiaris*) is part of the medical clinic routine for small animals and is the most reliable test used to compare different methods of semen manipulation and also different technique for semen preservation. Fertility tests *in vivo* are very difficult to be done in domestic *canidae* due to the need of positive pregnancy to prove seminal characteristics, long duration of the bitch estrous cycle and also the low efficient of induction and synchronization of estrous protocols on this species. For this reason, most of the studies focus on the use of *in vitro* tests for evaluation of sperm quality whether fresh, chilled, or frozen. Semen evaluation includes mainly sperm motility and viability, membranes integrity, acrossomal integrity, morphology, sperm DNA quality, binding capacity test and oocyte fertilization capacity. Breeders have proposed large invest money to reproduce specific breeds. Veterinary service is needed to make possible the transportation of semen samples between different cities and countries, as well as the assessment of a bitch from large geographic distances. The technique of chilling the semen maintains the semen sample viability for 24 to 96 hours, making possible use of the sample even if the male is not present at a different location. The aim of this study was to evaluate sperm quality in three different chill periods, verifying the pregnancy rate and the main *in vitro* semen quality . Forty-eight bitches were inseminated with semen collected from the dogs with the same breeds. The semen samples used for insemination were process from four different methods, they are fresh semen (GC), or refrigerated for 24 hours (G24),

48 hours (G48) and 72 (G72). At the time of artificial insemination, the samples were evaluated in each of the in vitro tests mentioned above. Evaluate to the effects of process cooling seminal parameters in vitro showed that during the process of cooling the semen quality decreases gradually, presenting results of the evaluations in vitro, lower in the samples chilled in the control group (without refrigeration). Between them, in each group refrigerated for different periods, the longer exposure of the sample at low temperatures, the worse the evaluation indices of the samples. In relation to the index pregnancy, there is a similar result, with the process of cooling the number of pregnant bitches is less, from values of 100% positive pregnancy with fresh semen and 24 hours of cooling, up to 83% positivity in samples refrigerated for 48 hours until the rate of pregnancies with zero samples refrigerated for 72 hours. Comparing in vitro with in vivo results (positive pregnancies) there is high correlation between each of the laboratory parameters evaluated with the number of pregnancies in the same sample used for artificial insemination, again it is observed that the cooling process in evaluations vitro quality and consequently decrease the number of pregnant females also presents less. Data from this study allow us to conclude that the cooling process significantly reduces sperm quality laboratory analysis, and the pregnancy rate of inseminated females. Moreover, in dogs and motility assessments of spermatoc vigor, functional testing and membrane oocyte binding assay evaluations are faithful and with great ability to predict the quality of fertilizing a semen sample.

Key Words: Semen, chilling, artificial insemination

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Avaliação seminal e determinação da fertilidade <i>in vitro</i> .....	19
2.2. Refrigeração do sêmen canino .....	26
2.3. Fisiologia Reprodutiva da cadela e determinação do momento ovulatório .....	31
3. OBJETIVOS DO ESTUDO.....	41
4. METODOLOGIA .....	42
4.1. Animais .....	42
4.2. Seleção dos Doadores de Sêmen .....	44
4.3. Coleta e Avaliação do Sêmen .....	45
4.4. Refrigeração e Armazenamento de Sêmen .....	49
4.5. Acompanhamento da Fêmea e Inseminação Artificial .....	50
4.6. Confirmação Ultrassonográfica da Gestação e Parto .....	52
4.7. Análise Estatística .....	54
4.8. Delineamento Experimental .....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
6. CONCLUSÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## 1. INTRODUÇÃO

A conservação do sêmen canino bem como a inseminação artificial vem sendo uma prática crescente na clínica reprodutiva de pequenos animais nos últimos anos. Ao selecionar animais com maior valor zootécnico, médicos veterinários especialistas em reprodução assistida objetivam, além da otimização da capacidade reprodutiva de um casal, manter por mais tempo a qualidade seminal, visando a conservação das amostras por períodos mais longos e assim possibilitando maior tempo de deslocamento até que estas sejam utilizadas na inseminação.

A cada dia mais criadores se consolidam, e estes, sempre buscam otimizar o potencial genético do seu plantel por meio do acasalamento entre machos e fêmeas de planteis diferentes. Buscando reduzir os gastos, os riscos e estresse de deslocamento de animais entre estados e até mesmo entre países, o mais viável e atualmente realizado é o envio de amostras de sêmen refrigerada ou congelada para inseminação artificial.

Com essa finalidade deve-se ter certeza de que a fêmea a ser inseminada tenha sido corretamente monitorada quanto ao momento de ovulação, e de que o material enviado (sêmen) tenha a capacidade chegar ao local de destino com qualidade suficiente, permitindo que os espermatozóides mantenham sua capacidade fecundante. Para obtenção de sucesso neste aspecto, vários fatores

podem interferir, como: a qualidade do sêmen no momento da coleta, o cuidado no momento do processamento (resfriamento) da amostra, a escolha de um diluidor e protetor celular ideal, a temperatura equilibrada de refrigeração e principalmente o tempo desde o processamento até a utilização para inseminação artificial.

Ao chegar ao local de destino, as amostras devem ser avaliadas antes do processo de inseminação. Os testes de avaliação seminal buscam prever a capacidade fecundante de uma amostra, e conseqüente a possibilidade de produzir a gestação positiva em uma fêmea. Os testes rotineiramente utilizados são realizados *in vitro*, e permitem a estimar a capacidade fecundante de uma amostra antes que esta seja utilizada no processo de inseminação. Porém sabe-se que a melhor forma de avaliar uma amostra seria com o índice gestacional após a inseminação artificial.

Com objetivo de determinar o efeito do processo de refrigeração por diferentes períodos de tempo na qualidade seminal em cães, amostras seminais refrigeradas por 24, 48 e 72 horas foram avaliadas por meio dos testes *in vitro*: motilidade, vigor, funcionalidade de membrana e teste de ligação oocitária. Os resultados dos testes laboratoriais foram ainda correlacionados o índice de gestação positiva de fêmeas inseminadas com as mesmas amostras seminais testadas *in vitro*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Uma vez que muitos dos parâmetros avaliados *in vitro* não são correlacionados com a real capacidade fertilizante do espermatozóide, a inseminação artificial ainda é o teste mais confiável ao se comparar os métodos de manipulação e preservação de sêmen (AMMAN & HAMMERSTEDT, 1993). Porém em cães, os testes de fertilidade *in vivo* são difíceis de serem realizados devido a algumas particularidades logísticas como: o número de cadelas necessário para provar a característica seminal e a longa duração do ciclo estral dessas fêmeas. Diferentemente de outras espécies, em cães deparamos ainda com a baixa eficiência dos protocolos de indução e sincronização de estro. Além disso, deve-se ter em mente que os resultados de fertilidade *in vivo* são dependentes não apenas da qualidade seminal, mas também de fatores inerentes à fertilidade da fêmea, o que dificulta ainda mais a avaliação (EILTS, 2005).

### 2.1. Avaliação seminal e determinação da fertilidade *in vitro*

A determinação da fertilidade do macho realizada com amostras seminais e baseada nos testes *in vitro* tem sido extensivamente estudadas em várias espécies, incluindo bovinos (KASTELIC & THUNDATHIL, 2008), suínos (GADEA,

2005), pequenos ruminantes (O'MEARA *et al*, 2008 e SÁNCHEZ-PARTIDA *et al*, 1999), humanos (AITKEN, 2006 e LEWIS, 2007) e cães (KUSTRITZ, 2007 e STROM *et al*, 2000).

As avaliações espermáticas buscando prever a qualidade seminal incluem motilidade e vigor espermático, integridade de membrana, integridade acrossomal, morfologia, qualidade do DNA celular e capacidade ligante e de fecundação oocitária. A relação existente entre os recursos utilizados para classificar a qualidade seminal, assim como prever a capacidade fecundante de uma amostra são variáveis e por vezes diferentes (AITKEN, 2006).

Inicialmente a microscopia para avaliação de motilidade e vigor espermáticos eram os testes mais comuns a serem utilizados, porém a subjetividade das avaliações geravam dúvidas nos resultados encontrados. Estas dificuldades obrigaram pesquisadores a aprimorarem as formas de avaliação seminal, utilizando outros testes *in vitro* e *in vivo*. Várias técnicas de avaliação seminal *in vitro* têm sido descritas, permitindo dados mais precisos sobre a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen canino. Esses novos métodos permitem a avaliação de diversas características funcionais dos espermatozoides, relacionadas com a capacidade de ligar, penetrar e fertilizar o oócito (HEWITT & ENGLAND, 2001).

Para fertilização oocitária, o espermatozoide deve ter a capacidade de desempenhar de forma eficiente várias funções. Novas tecnologias de avaliação seminal visam prever a capacidade fecundante final da célula espermática com técnicas que podem ser divididas em quatro diferentes categorias: 1) uso de corantes fluorescentes, que visam indentificar a funcionalidade acrossomal e a viabilidade espermática; 2) análise espermática assistida por computador (CASA);

3) avaliações de integridade de membrana espermática; 4) ensaios de ligação e penetração oocitária *in vitro*.

Os testes utilizando sondas fluorescentes e a análise computadorizada exigem equipamentos mais caros e que podem fugir da realidade de muitos pesquisadores que trabalham na prática com reprodução de cães. O teste hiposmótico, que é um método utilizado para avaliação da funcionalidade da membrana espermática, é um método simples, de baixo custo e sem necessidade da utilização de equipamentos dispendiosos, desta forma pode ser incorporado à rotina de um número maior de profissionais. Além disso, sugere-se ainda que os testes de ligação ou penetração oocitárias sejam os que mais se aproximam da realidade sobre a qualidade da amostra analisada. (RIJSSELAERE *et al*, 2005)

#### 2.1.1. Motilidade e vigor espermáticos

A avaliação da motilidade espermática é definida como o percentual de espermatozoides móveis de um ejaculado e o vigor representa a intensidade com a qual as células espermáticas se locomovem. O conjunto destas duas avaliações é um importante parâmetro da qualidade e viabilidade do sêmen canino. O movimento retilíneo progressivo é considerado normal em cães e sugere habilidade e viabilidade para fertilizar o ócito (FELDMAN & NELSON, 1996 e CBRA, 1996).

Mesmo com toda variabilidade à qual está sujeita, na maioria das pesquisas realizadas na área de tecnologia de sêmen canino, a avaliação subjetiva da motilidade e do vigor espermáticos continuam sendo os principais parâmetros verificados após a coleta de uma amostra seminal ou após o processo

de refrigeração, congelamento e descongelamento (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

Estudos sugerem que em cães, a motilidade progressiva associada ao vigor espermático estejam diretamente relacionados com a morfologia normal dos espermatozoides e que padrões ideais de morfologia espermática estariam diretamente associados a índices melhores de fertilização (AGARWAL *et al*, 2006). A motilidade espermática está relacionada com capacidade fertilizante, por demonstrar a competência estrutural e funcional do espermatozoide (PEÑA-MARTINEZ, 2004). Em suínos verifica-se alta correlação entre a qualidade da motilidade espermática e a taxa de parto e número total nascimento (GADEA *et al*, 2004).

Embora na espécie canina já tenham sido realizados estudos que mostrem que a motilidade está geralmente relacionada à integridade de membrana plasmática (KUMI-DIAKA, 1993) e à morfologia, a existência de correlações entre motilidade espermática e fertilidade *in vitro* ou *in vivo* permanece por ser melhor esclarecida.

#### 2.1.2. Teste Hiposmótico (HOST)

O teste hiposmótico foi proposto pela primeira vez por Drevius (1963) que verificou que as caudas dos espermatozoides bovinos mostravam-se curtas e enroladas sempre que a célula era exposta a soluções com osmolaridade reduzida. Tal fato voltou a ser relatado anos seguintes com espermatozoides humanos e de roedores (DREVIUS & ERIKSSON, 1966).

A proteção da membrana plasmática de espermatozoides é um pré-requisito para o metabolismo e a função celular, dessa maneira o objetivo deste

teste é avaliar a integridade e funcionalidade da membrana espermática, seguindo o princípio de que espermatozóides que possuam membranas intactas, uma vez submetidos a soluções hiposmóticas, tornam-se edemaciados com a movimentação do fluido para dentro da célula, o que acarreta o enrolamento da cauda (SPITTALER & TYLER, 1985).

Nas últimas décadas, estudos iniciaram seus relatos associando os resultados obtidos com os testes de baixa osmolaridade com os resultados de fertilização daquelas amostras seminais (VAN DER VEM *et al*, 1986). Em bovinos já foi demonstrado que a resposta osmótica do sêmen fresco estaria correlacionada com a fertilidade (REVEL & MRODE, 1994 e PEREZ-LLANO *et al*, 2001). No entanto, na espécie suína, já foi verificado que a informação sobre a estrutura da membrana não está intimamente associada com a fertilidade, talvez pelo fato dela fornecer informações sobre a viabilidade dos espermatozóides, mas não sobre a sua funcionalidade, como processos de capacitação, reação acrossômica, e capacidade de ligação em oócitos (GADEA *et al*, 2004).

Em cães somente na década de 90 concluiu-se que os testes hiposmóticos indicavam fielmente a integridade de membrana espermática, e a partir deste momento incorporou-se a avaliação na rotina das análises de sêmen canino (KUMI-DIAKA, 1993 e KUMI-DIAKA & BADTRAM, 1994). Inicialmente recomendava-se a incubação das células por períodos de 30 a 60 minutos em meios hiposmóticos de soluções de sacarose. Porém, a necessidade de otimizar os testes laboratoriais fizeram com que estudos buscassem aperfeiçoar esta técnica em diversos laboratórios. Em estudo posterior, com o intuito de se reduzir o tempo de incubação para a realização deste teste, compararam-se os resultados de uma amostra de sêmen que esteve 60 minutos em contacto com o

meio hiposmótico, com outra que esteve apenas 1 minuto. Concluiu-se que não havia diferença significativa entre os métodos e ficou demonstrada a facilidade de realização deste teste por qualquer veterinário clínico (PINTO & KOZINK 2008). Atualmente alguns autores demonstraram que as amostras têm resultados igualmente satisfatórios quando incubadas com água ultrapura ou destilada por períodos de 5 minutos (HISHINUMA & SEKINE, 2003).

### 2.1.3. Teste de Ligação

A capacidade de ligação oocitária representa um evento crítico para o espermatozóide no momento que antecede a fertilização e possivelmente possa estar relacionado com o potencial fertilizante do espermatozóide. Os ensaios que avaliam a capacidade de ligação de uma amostra de sêmen têm como objetivo prever a capacidade fecundante dessa amostra, o que supostamente estaria diretamente relacionado com o potencial de fertilização de um macho. Na prática, estimar se uma amostra seminal está ou não em condição fértil no momento do exame. A idéia de que este teste estaria próximo dos resultados fecundantes do espermatozóide *in vivo* baseia-se no fato de que através desta análise laboratorial seria possível detectar lesões nas células espermáticas em nível molecular impossíveis de serem detectadas por meio das técnicas convencionais de análise de sêmen (RIJSSELAERE *et al*, 2005).

Esta avaliação da capacidade de ligação à zona pelúcida já tem sido realizada por dois tipos de técnicas: uma em que se usam oócitos intactos e outra em que os oócitos são seccionados ao meio (teste de hemizona). A vantagem desta última técnica é que permite comparar as capacidades de ligação dos espermatozóides do mesmo macho submetido à tratamentos diferentes, ou ainda

o uso de machos diferentes sem o risco de variação da célula oocitária na resposta ao teste (MENDONÇA, 2010). Porém a necessidade de um equipamento específico para a secção do oócito fez com que autores buscassem a utilização de oócitos diferentes porém, coletados e selecionados de um mesmo *pool* folicular, reduzindo na medida do possível variações individuais.

A contagem dos espermatozoides ligados à zona pelúcida é feita com um microscópio de contraste ou de fluorescência (RIJSSELAERE *et al*, 2005), e já foi demonstrado que, para a espécie canina, a capacidade de ligação à zona pelúcida é uma característica específica dos espermatozoides vivos (STROM HOLST *et al*, 2000a e STROM HOLST *et al*, 2000b).

Vários experimentos com sêmen humano e de garanhões já indicaram correlação positiva entre o ensaio de ligação oocitária com a fertilidade do macho (FAZELI *et al*, 1995 e VIANA & BOLS, 2005). Em cães, alguns métodos para triagem de amostras seminais vêm sendo rotineiramente utilizados como estimativas de motilidade, integridades de membrana, funções mitocondriais e acrossomais, baseando-se no uso de corantes fluorescentes para avaliação da funcionalidade da membrana. Porém testes de fertilização não são tão comuns devido a dificuldade de obtenção dos oócitos e pelos baixos índices de sucesso obtidos no desenvolvimento da técnica *in vitro*.

Ainda assim, o uso da técnica de ligação espermatozóide-oócito talvez seja um dos testes para análise seminal mais próximos da taxa de fertilidade real que a célula encontra *in vivo*. Variações individuais e ainda o manejo de refrigeração do sêmen podem interferir diretamente nestes valores, trazendo por vezes falsos resultados quando comparados com os índices gestacionais obtidos

após o uso das amostras para inseminação de fêmeas, sendo este um estudo que ainda exige muito estudo para espécie canina.

#### 2.1.4. Fatores que influenciam na avaliação do sêmen

Na análise de uma amostra seminal, deve-se sempre considerar que a qualidade do sêmen está diretamente relacionada com fatores externos como a técnica utilizada na colheita, o momento em que esta foi realizada, o tempo decorrido entre a colheita e a análise, a temperatura a que a amostra é mantida, o equipamento e técnicas utilizadas no processamento, entre muitos outros fatores (KUSTRITZ, 2007).

O macho selecionado deve ser investigado quanto possíveis alterações reprodutivas e sistêmicas, além de se considerar a idade e raça do animal, e a época do ano em que a colheita é realizada. Estudos demonstram que cães muito novos, muito velhos ou que nunca tenham reproduzido apresentam sêmen de pior qualidade (JOHNSTON *et al*, 2001 e KUSTRITZ, 2007). Os primeiros ejaculados de um cão que tenha alcançado recentemente a puberdade contêm grande quantidade de espermatozóides com defeitos e mortos. Sempre que haja uma amostra com grande número de células mortas ou imóveis, antes de se declarar a inaptidão de um cão para reprodutor, deve-se realizar uma segunda colheita e respectiva avaliação, tendo especial cuidado para minimizar defeitos resultantes da manipulação do sêmen (FELDMAN & NELSON, 2004).

As diferenças do ejaculado relacionadas com a raça envolvem principalmente o porte do animal, pois o número total de espermatozóides parece estar positivamente correlacionado com a quantidade de massa testicular. Assim, quanto maior o cão, maior a massa testicular, maior produção espermática diária

e conseqüente aumento do número total de espermatozoides (JOHNSTON *et al*, 2001 e KUSTRITZ, 2007).

Independentemente de todos estes fatores que influenciam a avaliação do sêmen, os espermatozoides examinados *in vitro*, ainda apresentam algumas características diferentes das que terão quando atingirem o trato reprodutivo da fêmea após a inseminação, uma vez que ainda não completaram todas as etapas que o deixam apto ao processo de fertilização, como a capacitação e reação acrossomal (KUSTRITZ, 2007 e WITTE *et al*, 2009).

Sugere-se que para a confirmação dos dados avaliados *in vitro*, testes *in vivo* deveriam ser realizados, o que culmina na necessidade de inseminação e comprovação da qualidade seminal com índices satisfatórios de gestação, o que por vezes inviabiliza a pesquisa ou avaliação completa do cão reprodutor.

## 2.2. Refrigeração do Sêmen Canino

O sêmen canino para ser conservado, pode ser refrigerado a 4 – 5 °C em refrigerador e utilizado dentro de poucos dias. A idéia da refrigeração é a manutenção da célula espermática viável por 24 a 96 horas, permitindo a utilização desse sêmen para processos de inseminação, sem necessariamente a presença do macho reprodutor. Este método colabora também com a troca de material genético entre criadores de diferentes áreas geográficas, reduzindo o estresse e gastos com deslocamento de matrizes e reprodutores. Porém, no processo de refrigeração, injúrias celulares, decorrentes de erros no processamento da amostra, podem ocorrer. Nestes casos, haveria redução da

qualidade e conseqüentemente da capacidade fecundante da amostra seminal. Por este motivo, no processo de refrigeração seminal, deve-se sempre utilizar um diluidor ao material coletado, pois além de fornecer nutrientes aos espermatozoides, previne o crescimento bacteriano, tem ação crioprotetora e ação tamponante. Deve-se ainda observar a curva de refrigeração e a temperatura da amostra durante o período de refrigeração (JOHNSTON *et al*, 2001).

Para qualquer processo de conservação é necessária a segunda fração do ejaculado, ou seja, a fração espermática. A seleção da segunda fração pode ser feita no momento da colheita, desprezando-se as frações prostáticas, ou por meio de centrifugação do ejaculado total, após o qual, se utiliza apenas o sedimento resultante (JOHNSTON *et al*, 2001). Ao contrário do que alguns pesquisadores pensavam, a diluição do sêmen na própria porção fluida (líquido seminal) do animal tem efeitos deletérios, havendo mesmo uma diminuição abrupta da motilidade e aumento de alterações do acrossoma logo no primeiro dia de refrigeração (ROTA *et al*, 1995).

Nas amostras refrigeradas, provavelmente os fatores que mais afetam a conservação do sêmen são o acúmulo de restos metabólitos ao longo do tempo, com correspondentes alterações do pH e osmolaridade, e a depleção do substrato energético (VERSTEGEN *et al*, 2005).

Vários estudos estão sendo desenvolvidos para determinação das melhores condições para a refrigeração do espermatozóide de cães, porém, muitos fatores são envolvidos no processo de refrigeração e, ainda hoje, nenhuma metodologia parece ser a ideal para todos os cães e para todos os ejaculados, principalmente devido às variações individuais às propriedades, como

sensibilidade osmótica entre espermatozóide de diferentes cães e ejaculados (EILTS, 2005 e MINTER & DELIBERTO 2005).

Um dos fatores cruciais para a qualidade da amostra após o reaquecimento envolve o uso de diluidores adequados. Como já foi visto, características tamponantes, substâncias energéticas, estabilizadores de membrana e antibióticos devem ser acrescentados ao diluidor seminal para refrigeração. As soluções tampão são usadas para manter o pH do diluidor, o sêmen canino mantém-se num pH ótimo entre 6,75 e 7,50. A capacidade de remoção de íons de hidrogênio resultantes do metabolismo espermático é fundamental para a composição dos diluidores de sêmen, muitas vezes os tampões como o TRIS (tris-hidroximetil aminometano) são utilizados com esse objetivo (JOHNSTON *et al*, 2001). Há autores que citam que o TRIS tem alguma ação na preservação da energia nos espermatozoides (SILVA *et al*, 2002).

Além disso, a célula espermática dos mamíferos necessita de fontes energéticas, não só para garantir a concretização das várias necessidades básicas de qualquer célula, como também, e principalmente, para preservar a sua motilidade. Os espermatozoides podem obter energia por fosforilação oxidativa mitocondrial ou por glicólise (PONGLOWHAPAN *et al*, 2004 e VOLPE *et al*, 2009). Para fornecimento de energia a essas células recorre-se à adição de glicose, frutose, manose, dextrose ou lactose nos diluidores. A glicose e a frutose são, sem dúvida, os recursos energéticos mais freqüentemente adicionados aos diluidores para conservação de sêmen de cão (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001; PALOMO *et al*, 2003, RIGAU *et al*, 2001 e RIGAU *et al*, 2002), sendo o acréscimo desses açúcares indicados em grandes quantidades. Ao se conservar uma amostra, o consumo energético é bastante intenso nas primeiras 24 horas,

devido à grande atividade dos gametas durante este período, após a amostra atingir os 4°C registra-se uma diminuição razoável da sua concentração no diluidor, este momento culmina com a diminuição do metabolismo e das reações químicas e, conseqüentemente da motilidade dos espermatozoides (PONGLOWHAPAN *et al*, 2004).

Como forma de proteção e de estabilização da membrana plasmática ao choque térmico, a gema de ovo, as proteínas do leite e albumina sérica de bovino são substâncias usadas na confecção dos diluidores de refrigeração para sêmen de diversas espécies. A gema de ovo e as proteínas do leite ainda previnem a perda ou substituem fosfolípidios da membrana dos espermatozóides (VERSTEGEN *et al*, 2005) conferindo proteção contra alterações da pressão osmótica (WITTE *et al*, 2009) e tendo um papel protetor contra a reação espontânea do acrossoma, embora não se saiba ainda o mecanismo concreto que ocorre (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001). No entanto, há autores que propõem a hipótese desta ação protetora ser derivada de uma interação específica entre lipoproteínas de baixa densidade do ovo (LDL) com algumas proteínas maiores do líquido seminal (MANJUNATH *et al*, 2002 e BENCHARIF *et al*, 2010), deste modo é diminuída a perda de colesterol e fosfolípidios da membrana dos espermatozóides, prevenindo a capacitação prematura e subsequente reação do acrossoma (BERGERON *et al*, 2004).

Atualmente a gema de ovo é considerado um material biológico de risco, devido à recente dispersão de doenças zoonóticas das aves, com ênfase para a gripe aviária, o que tornou extremamente difícil o transporte de sêmen diluído em gema de ovo, e em alguns países foi proibida a sua importação ou exportação

(ABE *et al*, 2008). Por este motivo tem-se optado cada vez mais os diluidores à base de leite desnatado (BECCAGLIA *et al*, 2008).

Para inibição do crescimento bacteriano no sêmen, é freqüentemente adicionado ao diluidor antibióticos. A associação mais frequentemente usada é de sódio-benzilpenicilina (ou penicilina G) e sulfato de dihidroestreptomicina (ABE *et al*, 2008; BECCAGLIA *et al*, 2008 e PONGLOWHAPAN *et al*, 2006). A gentamicina é outro antibiótico que se pode adicionar aos diluidores. O tipo de antibiótico adicionado ao diluidor pode ter influência sobre a motilidade espermática, já tendo sido demonstrado que a gentamicina acima de uma determinada concentração diminui a motilidade espermática em sêmen de garanhões (AURICH & SPERGSE, 2007).

A diluição do sêmen de cão nos meios diluidores pode ser feita quer em proporções de volume definidas (ex.: uma parte de sêmen para três de diluidor), ou determinando a concentração inicial de espermatozóides e ajustando a quantidade de diluidor de acordo com a concentração final para dose inseminante ou dose de avaliação. Este último método adapta um meio melhor para as células, uma vez que a quantidade do diluidor acrescida não é dependente do volume de sêmen que vai ser adicionado. Embora os cães apresentem boas taxas de fertilidade com o sêmen refrigerado, a melhoria do processamento da amostra permitiria reduzir as doses de inseminação necessárias. Alguns autores demonstraram que a adequação da concentração espermática para dose inseminante deveria ser entre 150 e 200 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (MICHAEL *et al*, 2009 ).

A curva de resfriamento e a manutenção da temperatura durante o armazenamento do sêmen são fatores que devem ser cuidadosamente

acompanhados. As oscilações de temperatura ao longo desse período são altamente deletérias à amostra. Também foi demonstrada a importância do tipo de container de armazenamento no caso de transporte do material, tendo total interferência na sua qualidade final. O Equitainer® (reservatório normalmente utilizado para transporte de sêmen de equino) apresentou melhores resultados ao fim de 72 horas do que a caixa de isopor ou a garrafa isotérmica. O Equitainer® tem uma taxa de refrigeração controlada de  $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e mantém uma temperatura final de  $4-6^{\circ}\text{C}$  por mais de 70h a uma temperatura ambiente de  $22^{\circ}\text{C}$  (LOPES *et al*, 2009). No caso do uso de refrigeradores domésticos, deve-se ter total cuidado para que as amostras fiquem ao fundo do aparelho, o mais distante possível da porta o que reduz o desequilíbrio da temperatura no momento de abertura do refrigerador, ainda assim torna-se indispensável o uso de termômetro que monitore a temperatura interna e do ambiente onde a amostra está sendo armazenada.

### 2.3. Fisiologia Reprodutiva da Cadela e Determinação do Momento Ovulatório e da Inseminação Artificial

Para entendimento dos aspectos reprodutivos nas fêmeas de mamíferos é indispensável que se conheça bem todos os fatores que envolvem a fisiologia ovariana e seus acontecimentos durante o período reprodutivo dessa fêmea (HAFEZ, 1995).

As cadelas apresentam um ciclo estral com algumas particularidades se comparadas a outras fêmeas de mamíferos. Estas fêmeas são classificadas monoéstricas e predominantemente não-estacionais. Isso quer dizer que

apresentam um único cio em cada estação de cobertura, e que em geral este não é influenciado pela época do ano (HOFFMAN *et al*, 1996).

O ciclo estral canino completo é dividido em 4 fases: proestro, estro, diestro e anestro. Sendo a cadela a única espécie a passar obrigatoriamente por cada uma das fases independentemente de acontecer a gestação. O mais comum é que a cadela apresente dois períodos de cio por ano, porém pode ocorrer variação de um até quatro episódios anuais de acordo com a raça e características individuais de cada animal (JOHNSTON *et al*, 2001).

Atualmente, o ciclo estral em canídeos domésticos pode ser bem definido, baseados em exames clínicos, aspectos comportamentais, eventos ovarianos, mensuração da concentração plasmática de hormônios e pela citologia vaginal, o que é indispensável dentro de um manejo reprodutivo que envolva a monta controlada ou inseminação artificial.

A citologia vaginal é um dos exames mais simples e que colaboram com a previsão da etapa reprodutiva em que a cadela se encontra. É um método rápido e de baixo custo comumente utilizado para estudo do ciclo estral. As células do epitélio vaginal respondem ao aumento da concentração plasmática de E<sub>2</sub> durante o proestro com alterações que incluem a mudança de epitélio estratificado cubóide para epitélio estratificado escamoso com mais de 30 camadas de células e queratinização celular (JOHNSTON *et al*, 2001). A função do epitélio, nesta fase, é similar a da pele ou algumas outras membranas, um mecanismo de proteção, neste caso à cópula. Dessa forma é possível diferenciar cada fase do ciclo estral pela presença de determinados tipos celulares.

A principal ação do E<sub>2</sub> é promover o espessamento do epitélio, tornando as células do lúmen vaginal cada vez mais distantes de seu suprimento sanguíneo e

promovendo assim proteção à mucosa no momento da cópula. Nesse sentido, as diferentes células encontradas na citologia vaginal designam distintos estágios de morte celular. As células possivelmente encontradas e usadas na avaliação da fase do ciclo estral são (respectivamente em ordem de avanço de queratinização):

- células basais e parabasais - menores células encontradas no esfregaço, morfologicamente esféricas ou por vezes ovais, com núcleo grande, e pequena quantidade de citoplasma;
- células intermediárias - maiores que as parabasais, podendo atingir o dobro do tamanho, possuem núcleo menor e assim, maior quantidade de citoplasma, o que se traduz como o primeiro sinal de morte celular;
- células superficiais - são as maiores células encontradas e típicas representantes da morte celular, apresentam as bordas angulares, podendo exibir núcleo picnótico ou ausência total deste, além disso, é possível que se encontre hemácias e neutrófilos (JOHNSTON *et al*, 2001).

A proporção de cada tipo celular torna-se mais ou menos frequente em cada uma das fases do ciclo estral, possibilitando assim sua diferenciação por meio de avaliação do esfregaço vaginal corado.

A definição do momento ideal para cobertura ou inseminação artificial pode ser definido com a associação dos exames citológicos e da verificação dos níveis plasmáticos de progesterona. A associação das duas técnicas permite uma maior acurácia na definição do momento ovulatório ideal. Em geral o início do proestro é acompanhado citologicamente até o momento que as mudanças celulares indiquem a possibilidade do início do período de ovulação, neste período em geral é realizada a primeira mensuração de progesterona o que confirma a elevação do hormônio circulante e conseqüente luteinização das células foliculares.

Alguns estudos diferem sobre a definição da concentração de níveis hormonais sanguíneos no momento da ovulação da cadela, o que pode ser explicado pelas diferenças nas amostras investigadas (plasma ou soro), por preparações diferentes (com ou sem separação cromatológica) ou por diferenças nos métodos bioquímicos empregados (radioimunoensaio ou ligação protéica) na mensuração. As variações podem também ser atribuídas a diferenças raciais, ao número de óvulos liberados por animal ou à idade (CHRISTIANSEN, 1984).

Johnston et al. (2001) citam também variações diurnas, principalmente progesterônicas, sendo os níveis detectados em um estudo duas vezes maiores pela manhã do que os observados à tarde. A progesterona apresenta concentração basal na ordem de 1ng/ml, precedente ao pico pré-ovulatório de LH. Este valor quase que triplica já no primeiro dia após a ovulação, elevando-se para cerca de 10ng/ml durante o estro e permanecendo em torno de 22ng/ml durante o diestro, voltando para os valores basais em 61-65 dias na fêmea prenhe e 51-82 dias naquelas não prenhes (BURKE, 1991). Porém, JOHNSTON et al. (2001) relatam que os valores progesterônicos podem chegar a 15-90ng/ml aos 15-30 dias após o pico pré-ovulatório de LH.

Em acompanhamento hormonal ao longo do ciclo estral foram observados valores séricos de progesterona em concentrações crescentes do proestro (2,85ng/ml) em direção ao estro (5,20ng/ml), bem como as concentrações médias de progesterona elevando-se discretamente no final do proestro (de 1,56 para 2,85ng/ml) concomitantemente com o início do declínio das concentrações de estradiol (de 20,93 para 18,81pg/ml) no mesmo período (BENETTI, 2004).

As alterações tanto citológicas como nos níveis plasmáticos de progesterona são verificadas com a mudança de cada uma das fases do ciclo estral em cadelas.

### 2.3.1. Proestro

Esta fase tem duração bastante variável, mas possui em média nove dias. Clinicamente esta é a fase em que iniciam os sinais característicos do cio nas cadelas, como hiperemia e edema vulvar e de cérvix, presença de descarga sero-saguinolenta e liberação de ferormônios, com conseqüente atração do macho, mas sem permissão de monta (ALLEN, 1995).

Ocorre rápido desenvolvimento folicular, elevação da concentração plasmática de  $E_2$ , pico de LH e início da elevação da secreção de  $P_4$ , com redução na concentração de FSH (SILVA *et al* , 2002).

A citologia de cadelas nesta fase do ciclo pode ser ainda subdividida em fases inicial, intermediária e final. A fase inicial é marcada pela presença de hemácias no campo, presença de células parabasais, intermediárias, neutrófilos e bactérias. O aspecto microscópico é de um fundo de lâmina bastante corado pela presença de muco conseqüente da produção de grande quantidade de secreções cervicais e vaginais da cadela nesta fase (FELDMAN & NELSON, 2004).

Na fase intermediária não são comumente observados neutrófilos no esfregaço, pois, com o espessamento da camada epitelial, as células leucocitárias não conseguem penetrar a barreira celular e desembocar no lúmen vaginal. As células parabasais e intermediárias vão sendo progressivamente substituídas por células superficiais nucleadas e anucleadas. Durante a fase final, neutrófilos não

são encontrados e a presença de hemácias é variável. O aspecto citológico da fase final do proestro é bastante semelhante ao estro, ou seja, com mais de 80% das estruturas observadas no campo visual de células superficiais nucleadas e anucleadas (FELDMAN & NELSON, 2004).

### 2.3.2. Estro

Nesta fase ao exame clínico verifica-se vulva aumentada e de consistência macia e redução das descargas hemorrágicas. A fêmea passa a aceitar a monta, apresentando desvio e movimentos de cauda, desloca a região posterior com exposição da genitália para o macho (ALLEN, 1995), mantendo os membros posteriores em “posição de cavalete”. Em geral a fêmea passa aceitar a monta um pouco antes do pico ovulatório de LH. O aspecto ovariano também sofre algumas modificações, iniciando o rompimento dos folículos (ovulação) e início do desenvolvimento do corpo lúteo (FELDMAN & NELSON, 2004).

Em relação às concentrações hormonais observa-se o aparecimento do pico de FSH e LH, seguido da ovulação, redução na síntese de  $E_2$  à concentração basal, desenvolvimento do corpo lúteo e aumento na síntese e secreção de  $P_4$ . O momento exato de ovulação nesta fase é difícil de ser definido, devido ao fato de que os folículos se desenvolvem também em períodos de tempo bastante variáveis, sendo que a maioria das ovulações ocorre entre 48 e 72 horas após o pico plasmático de LH (FELDMAN & NELSON, 2004).

As lâminas citológicas nesta fase permanecem geralmente constantes, não se observando neutrófilos e com praticamente toda a lâmina apresentando células superficiais queratinizadas (período de máxima influência estrogênica).

Eritrócitos podem ser encontrados e o aspecto do esfregaço é claro. A partir do momento em que a lâmina de citologia adquire esse aspecto, raramente ocorrem mudanças até o diestro (JOHNSTON *et al*, 2001).

### 2.3.3. Diestro

Ao contrário do que ocorre principalmente nas espécies voltadas para a produção animal, em cadelas, a formação do corpo lúteo antecede em até 48 horas a ovulação e seu desenvolvimento total encontra-se no diestro (48). Daí o fato da maioria dos autores não definirem a fase do metaestro nesta espécie. O metaestro em outros mamíferos se caracteriza pela instalação e formação do corpo lúteo, o que facilita a diferenciação entre as duas fases (diestro e metaestro). Já nos cães, se torna difícil uma determinação da fase metaestral apenas por características ovarianas.

Nas cadelas o diestro é percebido no momento de atividade total do corpo lúteo (independente de ocorrência ou não de gestação). No caso de fertilização, é neste período que possivelmente o embrião em fase de mórula estará chegando ao útero (JOHNSTON *et al*, 2001). A duração média do diestro é de 60 dias, sendo encerrada com o parto (caso tenha ocorrido fertilização) ou com a regressão do corpo lúteo na fêmea não gestante (ALLEN, 1995).

Clinicamente inicia-se o desenvolvimento de glândula mamária e redução de edema vulvar, porém a presença de descargas hemorrágicas é bastante variável. Quanto ao comportamento sexual a fêmea passa a não aceitar mais a monta do macho. (JOHNSTON *et al*, 2001). Com a presença de células lúteas a concentração plasmática de  $P_4$  continua se elevando rapidamente, podendo

chegar até 90 ng/ml, esta concentração declina à valores basais durante 3 a 4 semanas após o início do diestro. Ao fim deste período verificamos pequenos pulsos de LH, enquanto a concentração plasmática de E<sub>2</sub> e FSH permanecem reduzidas (HOFFMAN *et al*, 1996).

Os esfregaços citológicos mostram, nos primeiros dias do diestro, redução de células superficiais para aproximadamente 20% das estruturas visualizadas no campo, sendo a substituição feita por células parabasais e intermediária. A quantidade de células nos campos pode ser reduzida pela intensa descamação durante o estro, e em geral, não há diferença citológica entre fêmeas gestantes e não gestantes (FELDMAN & NELSON, 2004).

#### 2.3.4. Anestro

Esta é geralmente a fase mais longa do ciclo estral de cadelas. Ela dura em média 4,5 meses, mas pode variar de 3 até 11 meses de acordo com a raça e idade da cadela, época do ano e ambiente, entre outros fatores. A característica mais marcante é que neste período o ciclo reprodutivo da cadela encontra-se em período de quiescência, com eventos de pouca importância nos aspectos clínicos e comportamentais. O ovário se apresenta em fim de fase luteal (corpo lúteo em regressão) e preparando-se para iniciar a fase folicular, com folículos antrais em vários estádios de desenvolvimento e atresia. As concentrações hormonais encontram-se em valores basais e o aspecto citológico mostra 90% de células parabasais e intermediárias, com presença reduzida de bactérias e neutrófilos (FELDMAN & NELSON, 2004).

### 2.3.5. Inseminação Artificial

A técnica de inseminação artificial em cães encontra-se atualmente amplamente difundida, com resultados semelhantes aos obtidos na monta natural, desde que o momento ovulatório seja definido da forma correta.

Segundo Concannon et al. (1977) a ovulação ocorreria de maneira sincrônica entre 36 e 50 horas após o pico do LH, sendo que neste período os oócitos não estariam ainda maduros, encontrando-se no estado de vesícula germinativa. A maturação seria então concluída dois a três dias mais tarde com a emissão do segundo corpúsculo polar (TSUTSUI, 1989). A partir desse momento, o oócito estaria apto a fecundação, mas a sua sobrevivência parece ser muito curta, de apenas 24 a 48 horas (CONCANNON & BATISTA, 1989). O limite máximo de fecundação se encontraria em torno de 6,5 dias depois do pico de LH (TSUTSUI, 1989), sendo o período ideal de fecundação entre três e quatro dias depois do pico. Devido a esta fisiologia tão particular para a espécie ocorre a necessidade de acompanhamento do ciclo estral de forma cuidadosa para somente após a realização das inseminações ocorrerem.

Como foi visto anteriormente, sugere-se que o método mais eficiente para se determinar o momento ótimo para a IA seja através da dosagem de progesterona plasmática, uma vez que a cadela é a única dentre as fêmeas domésticas que apresenta uma evolução da progesteronemia dois a três dias antes da ovulação. Segundo Johnston et al. (2001), o momento ideal para a realização da IA seria dois dias após a progesterona ter atingido concentrações entre 4 e 6 ng/mL. As inseminações podem ainda ser repetidas de 2 a 3 vezes em dias alternados ou não, e isso estaria diretamente relacionado com a mudança citológica da fase de estro da fêmea.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Verificar o efeito do tempo de refrigeração do sêmen canino nos índices gestacionais de cadelas domésticas.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Verificar o efeito do processo de refrigeração por 24, 48 e 72 horas na qualidade seminal de cães domésticos, por meio dos testes *in vitro*: motilidade espermática, vigor espermático, integridade de membrana (HOST) e teste de ligação oocitária.
- Verificar índices gestacionais de cadelas inseminadas com sêmen refrigerado por 24, 48 e 72 horas.
- Correlacionar os resultados dos testes de avaliação da qualidade seminal *in vitro* com os índices gestacionais.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais

#### 4.1.1. Machos

Foram utilizados 06 cães machos, adultos, com idades entre 1 ano e 6 meses e 4 anos e 6 meses, hípidos e com histórico reprodutivo comprovado por gestações anteriores. Os animais eram das seguintes raças: Bulldog Inglês (n=1), Bulldog Frances (n=1), Pug (n=1), Poodle (n=1), York Shire (n=1) e Chow chow (n=1).

Foi utilizado um macho para cada grupo de 04 cadelas inseminadas com sêmen fresco e sêmen refrigerado por 24, 48 e 72 horas. Devido a dificuldade de obtenção das 04 matrizes da mesma raça, no mesmo período do ciclo estral foi utilizado o mesmo doador, no entanto, com coletas seminais realizadas em diferentes momentos, para cada repetição. A manipulação e preparo do sêmen foi realizado pelo mesmo técnico, objetivando reduzir as variações no processamento das amostras.

Durante o experimento, todos os animais utilizados, foram previamente vermifugados e tiveram a vacinação atualizada quando necessário, bem como foram adaptados a um mesmo tipo e rotina de alimentação comercial (Royal

Canin Médiun, duas vezes ao dia, com quantidades seguidas pela recomendação do fabricante).

#### 4.1.2. Fêmeas

Foram utilizadas 48 fêmeas, adultas com idades entre 2 anos e 3 meses e 5 anos, divididas nas seguintes raças: Bulldog Inglês (n=8), Bulldog Francês (n=12), Pug (n=8), Poodle (n=8), York Shire (n=8) e Chow chow (n=4), sendo que de acordo com essa divisão racial foi utilizado um mesmo macho, em diferentes momentos do experimento, para inseminação artificial de diferentes fêmeas (repetições do mesmo grupo de tratamento). A figura 1 demonstra a divisão realizada entre as raças e o manejo de inseminação artificial.

As fêmeas utilizadas eram matrizes com histórico reprodutivo favorável (já haviam estado gestantes antes), sendo que o cio anterior ao utilizado no experimento nenhuma das cadelas esteve prenha. As fêmeas foram divididas por grupo de raça, tendo cada uma delas sido inseminada com macho da mesma raça e em um dos 4 tratamentos pré-determinados (fig. 1)

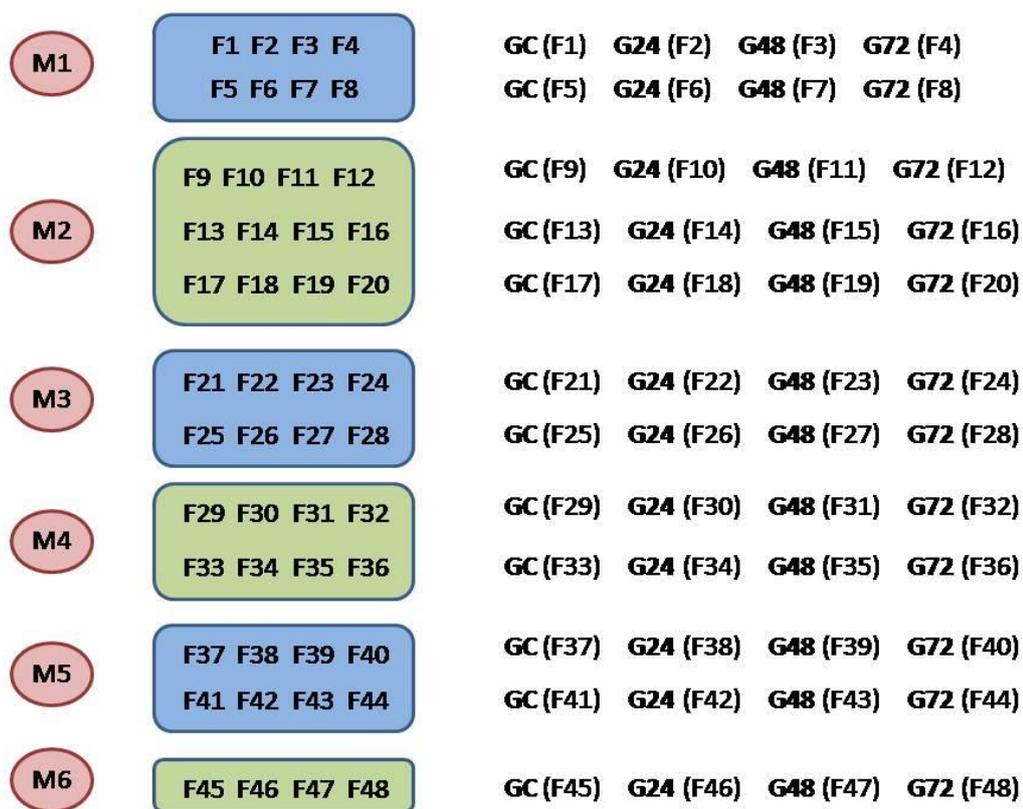


Figura 1. Delineamento experimental realizado no estudo. Indicando os seis diferentes machos utilizados (M1, M2, M3, M4, M5 e M6), as quarenta e oito fêmeas inseminadas (F1 até F48), bem como os grupos experimentais definidos, sendo grupo controle, com inseminações com sêmen à fresco (GC), grupo com sêmen refrigerado por 24 horas (G24), grupo com sêmen refrigerado por 48 horas (G48) e grupo com sêmen refrigerado por 72 horas (G72).

#### 4.2. Seleção dos Doadores de Sêmen

Os cães selecionados para o experimento foram avaliados quanto: interesse do proprietário em reproduzir o animal, disponibilidade do animal em

permanecer na cidade durante longos períodos (devido ao fato de vários animais participarem de exposições em outros estados), facilidade da coleta do sêmen e qualidade seminal preconizada nas normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Animais com sêmen de qualidade inferior a média padronizada pelo CBRA foram descartados para que não houvesse influencia no resultado final dos dados coletados. Os cães foram divididos entre grupos por raça.

O sêmen coletado foi avaliado quanto volume, motilidade, vigor, integridade de membrana (teste hiposmótico), teste de ligação oocitária, e índice de gestação. As avaliações seminais foram realizadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente neste estudo.

O período experimental foi setembro de 2008 a dezembro de 2010. As coletas seminais foram feitas nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, onde o sêmen era analisado, processado e/ou refrigerado, dependendo do grupo de tratamento. Os testes de ligação foram realizados no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

#### 4.3. Coleta e Avaliação do Sêmen

Os ejaculados foram coletados com recurso de estimulação manual, sem presença de fêmea em cio, usando-se tubo de plástico graduado acoplado a um funil plástico. A primeira fração do ejaculado foi desprezada, colhendo-se a

segunda fração até o seu fim. A terceira fração seminal foi coletada buscando aumentar o volume seminal, uma vez que o cálculo de concentração espermática seria posteriormente ajustada.

#### 4.3.1. Motilidade e Vigor espermáticos

Para determinação da porcentagem de espermatozoides móveis (0-100%) e a qualidade de movimentação da amostra (0-5) foi utilizada uma gota de sêmen fresco entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase com aumento de 10x e 20x. A porcentagem de células com movimentação variou de 0 (todas as células imóveis) a 100 (todas as células em movimento) e a intensidade de movimento progressivo dos espermatozoides (vigor) foi analisado pelo score de 0 (nenhum movimento) a 5 (movimento retilíneo).

#### 4.3.2. Concentração Espermática

Para a determinação da concentração (número de sptz/mL) foi utilizada uma diluição de 1:19. Para isto, 50µL do ejaculado foram adicionados a 950µL de água destilada. A solução foi utilizada para preencher a câmara hematócitométrica de "Neubauer". Após a sedimentação das células espermáticas por 02 minutos foi realizada a contagem em microscópio de contraste de fase com aumento de 40X. O número de células contadas foi expresso em espermatozoides por ml.

#### 4.3.3. Teste de Integridade de Membrana (HOST)

Para determinação do índice de integridade de membrana espermática em cada amostra foi realizada a diluição do sêmen em água destilada em 1:19 partes, mantida em banho maria à 37<sup>0</sup>C, seguida de incubação por 5 minutos. Após esse período, uma gota da amostra foi colocada entre lâmina e lamínula para contagem de 200 espermatozoides por amostra, neste grupo foram contados o número de células com cauda enrolada, o que definia a porcentagem de funcionalidade da membrana.

#### 4.3.4. Teste de Ligação Oocitária

Para o teste de ligação foram utilizados ovários coletados de fêmeas encaminhadas a rotina de ovariohisterectomia do Hospital Veterinário (HV-UENF). Devido a necessidade de obtenção dos oócitos em datas indefinidas (dependendo do período ovulatório da fêmea), um banco de cadelas doadoras de ovários foi cadastrado, e durante o período de acompanhamento reprodutivo da fêmea que seria inseminada, as cadelas a serem ovariohisterectomizadas eram contactadas, realizados os exames pré-operatórios e pré-agendada a cirurgia, de acordo com a necessidade dos oócitos para o teste de ligação.

Imediatamente após a cirurgia, os ovários eram acondicionados em 250 mL de solução de NaCL 0,9% a 38<sup>0</sup>C e levados ao laboratório, caso o início do procedimento fosse maior que 1 hora, era adicionado gentamicina (6,25mg) no meio em que os ovários se encontravam.

Os ovários foram dissecados e escarificados, em solução de PBS acrescidos de 0,4% BSA. Os oócitos foram contados em lupa e somente as estruturas com qualidade Grau 1 selecionados (HEWITT & ENGLAND, 1997). Os oócitos selecionados foram lavados e repassados a placa plástica de cultura em

meio Talp FIV, em gotas de 95 $\mu$ l com 10 oócitos em cada gota, e mantidos 1h em estufa equilibrada. As gotas foram cobertas com óleo mineral (FARSTAD, 2000).

A amostra seminal fresca ou refrigerada era ajustada e diluída em meio de cultivo espermático (Sperm Talp) para concentração final de  $400 \times 10^6$  espermatozóides/ml. Após homogeneização do meio, era adicionado 5 $\mu$ l da solução com espermatozóides em cada gota de cultivo oocitário, buscando atingir a concentração final de  $2 \times 10^6$  espermatozóides/mL para cada 10 oócitos.

As placas foram mantidas em estufa por 18 horas. Após o término do período de incubação as placas foram retiradas da estufa, os oócitos foram inicialmente verificados em lupa, retirados das gotas e lavados por duas vezes em solução de PBS acrescido de BSA. Após esse procedimento foram transferidos para *ependorf* com solução de citrato de sódio a 1% por dez minutos. O recipiente foi agitado em vórtex por 3 minutos e o volume retirado para uma placa de cultura novamente. As estruturas foram coletadas com o auxílio de micropipetas e colocadas em lâmina de microscopia com uma lamínula sobre os oócitos protegidos com gotas de silicone em cada canto das lâminas, evitando a ruptura das estruturas. As lâminas foram analisadas em microscópio de contraste de fase (KAWAKAMI *et al*, 1998).

Para cada repetição do teste foram preparadas 3 gotas (30 oócitos). A avaliação do número de espermatozóides ligados a zona pelúcida foi feita por contagem das células espermáticas e separados em 4 diferentes grupos de graduação: graduação 0 (nenhum espermatozóide ligado), graduação 1 (de 1 a 25 espermatozóides ligados), grupo 2 (de 26 a 50 espermatozóides ligados), grupo 3 (mais de 51 espermatozóides ligados) (Strom Holst *et al*. 2001).

#### 4.4. Refrigeração e Armazenamento do Sêmen

A preparação do diluente foi feita segundo o protocolo proposto por Kenney *et al* (1975), sempre pela mesma técnica e utilizando-se dos mesmos produtos. As porções eram preparadas e armazenadas em tubos plásticos separadamente, o material foi acondicionado em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$ , por no máximo 3 meses. No momento da diluição do sêmen, cada tubo era descongelado individualmente e aquecido em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização na amostra seminal coletada.

Para o cálculo do volume necessário de diluidor a ser adicionado a amostra seminal utilizou-se a fórmula  $V_1C_1 = V_2C_2$ , em que: **V1** é o volume da segunda fração seminal coletada; **C1** é a concentração inicial de sêmen fresco; e **V2** o volume final, de cada alíquota após diluição, para se obter uma concentração final **C2**, que foi estabelecida como  $200 \times 10^6$  espermatozóides/ml (MICHAEL *et al*, 2009 e MENDONÇA, 2010). O volume de diluidor adicionado foi  $V_2 - V_1$ .

O volume final da solução foi dividida em 2 *ependorfs* com 2ml (na concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozóides/ml) cada um deles, acondicionados da mesma maneira e no mesmo refrigerador equilibrado a  $4^{\circ}\text{C}$ . As amostras permaneciam em refrigeração até o momento de utilização, de acordo com o grupo de tratamento a ser adotado. Somente no momento de avaliação *in vitro* e inseminação artificial da fêmea as amostras eram retiradas do refrigerador (24, 48 ou 72 horas após o início do procedimento).

No momento da inseminação artificial todas as amostras preparadas em duplicidade foram utilizadas para realização dos testes *in vitro* (motilidade, vigor,

HOST e teste de ligação), e posterior comparação dos dados em relação aos índices gestacionais.

#### 4.5. Acompanhamento da fêmea e inseminação artificial

De acordo com a raça e com o doador de sêmen selecionado, as fêmeas foram divididas aleatoriamente em cada um dos grupos experimentais, onde a inseminação seria feita com sêmen fresco (GC), ou com sêmen refrigerado por 24 (G24), 48 (G48) ou 72 horas (G72). Foi realizada somente uma inseminação artificial em cada fêmea, de acordo com a amostra seminal em questão .

A definição do momento de inseminação foi feita de acordo com o acompanhamento citológico desde o primeiro dia de proestro, associado a mensuração dos níveis plasmáticos de progesterona que foram realizadas no momento em que a citologia indicava em média 70% de células queratinizadas. As amostras sanguíneas foram coletadas por venopunção no horário da manhã e encaminhadas ao laboratório. Foi utilizada a técnica de quimioluminescência para mensuração dos níveis plasmáticos hormonais. O resultado foi obtido no mesmo dia, e valores acima de 6ng/ml foram indicativos de realização da inseminação na parte da tarde do mesmo dias. Em situações onde o resultado foi inferior a 6ng/ml, outra amostra foi encaminhada nos dias seqüentes até obtenção do resultado estipulado (figura 2)

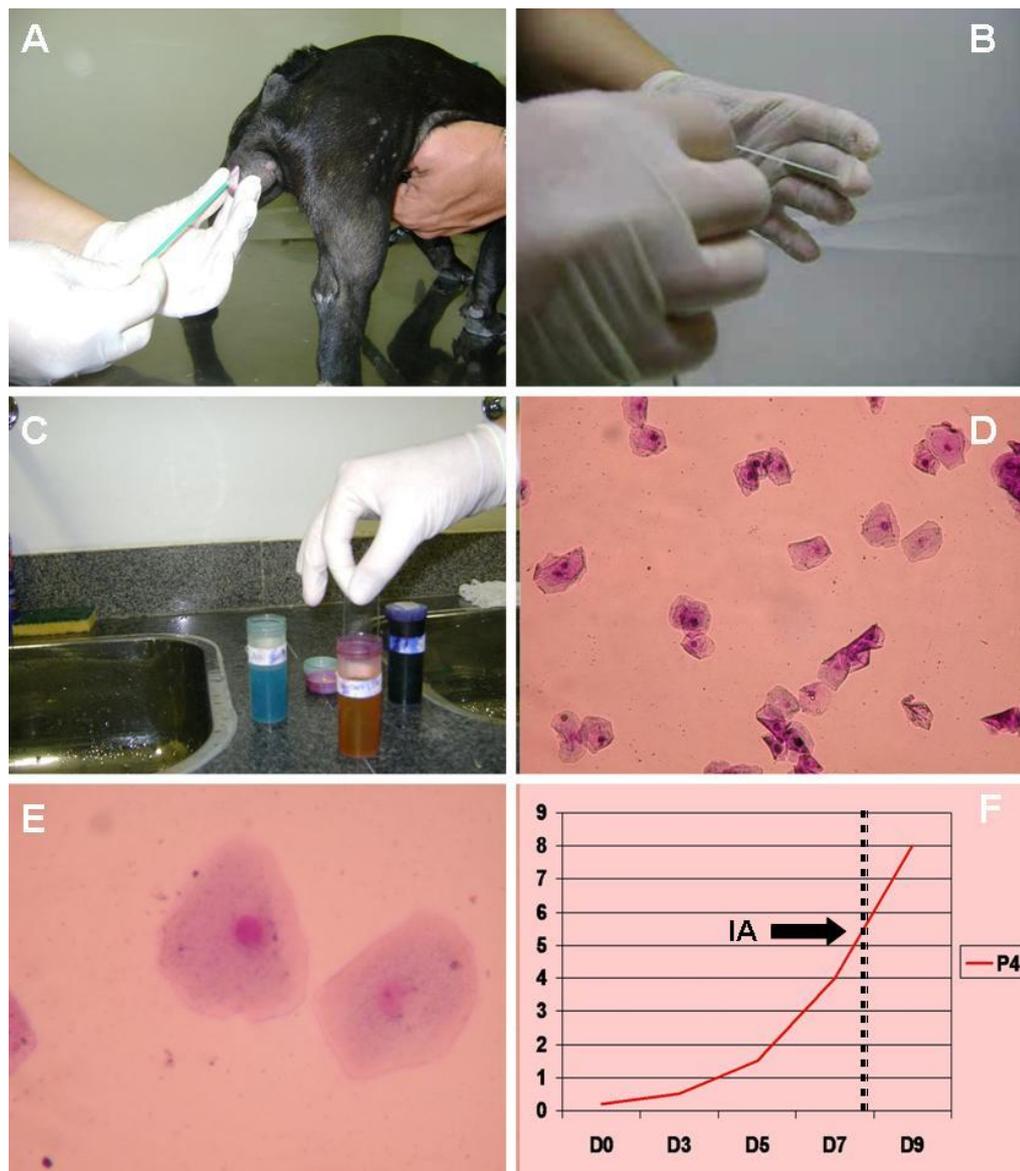


Figura 2. Acompanhamento e definição do momento ovulatório: Realização da citologia vaginal, coleta do material e preparação da lâmina de citologia (**quadrante A e B**), coloração das lâminas para avaliação em microscopia (**quadrante C**), leitura das lâminas indicando células queratinizadas e núcleo picnótico – células intermediárias e superficiais (**quadrante D e E**), curva dos níveis plasmáticos de progesterona, indicando valores superiores a 6ng/ml (**quadrante F**).

Independente da realização da inseminação artificial, as cadelas continuaram sendo acompanhadas e as citologias sendo realizadas diariamente, até o momento de mudança nas células citológicas que indicasse o primeiro dia do diestro. Este procedimento visou facilitar a previsão da data de parto e acompanhamento gestacional das fêmeas (Johnston *et al.* 2001).

#### 4.6. Confirmação Ultrassonográfica da Gestação e Parto

Para confirmação e acompanhamento gestacional foi utilizado aparelho de ultrassonografia veterinária com 2 transdutores multifrequenciais, sendo uma probe transversa e uma linear (Myndray DP 2200vet). O primeiro exame ultrassonográfico foi realizado aos 21 dias após o início do diestro citológico, sendo esta confirmada pela observação de vesículas embrionárias. Após esta data, outros dois exames eram realizados, aproximadamente aos 35 e 55 dias de gestação (figura 3).

Do total de fêmeas do experimento (n=48), vinte e três realizaram parto natural e foram acompanhadas durante o trabalho de parto. Nas vinte e cinco fêmeas restantes foi realizada cesariana eletiva devido às características raciais, particularidades anatômicas (animais braquicefálicos) e/ou histórico de distocia em partos anteriores.

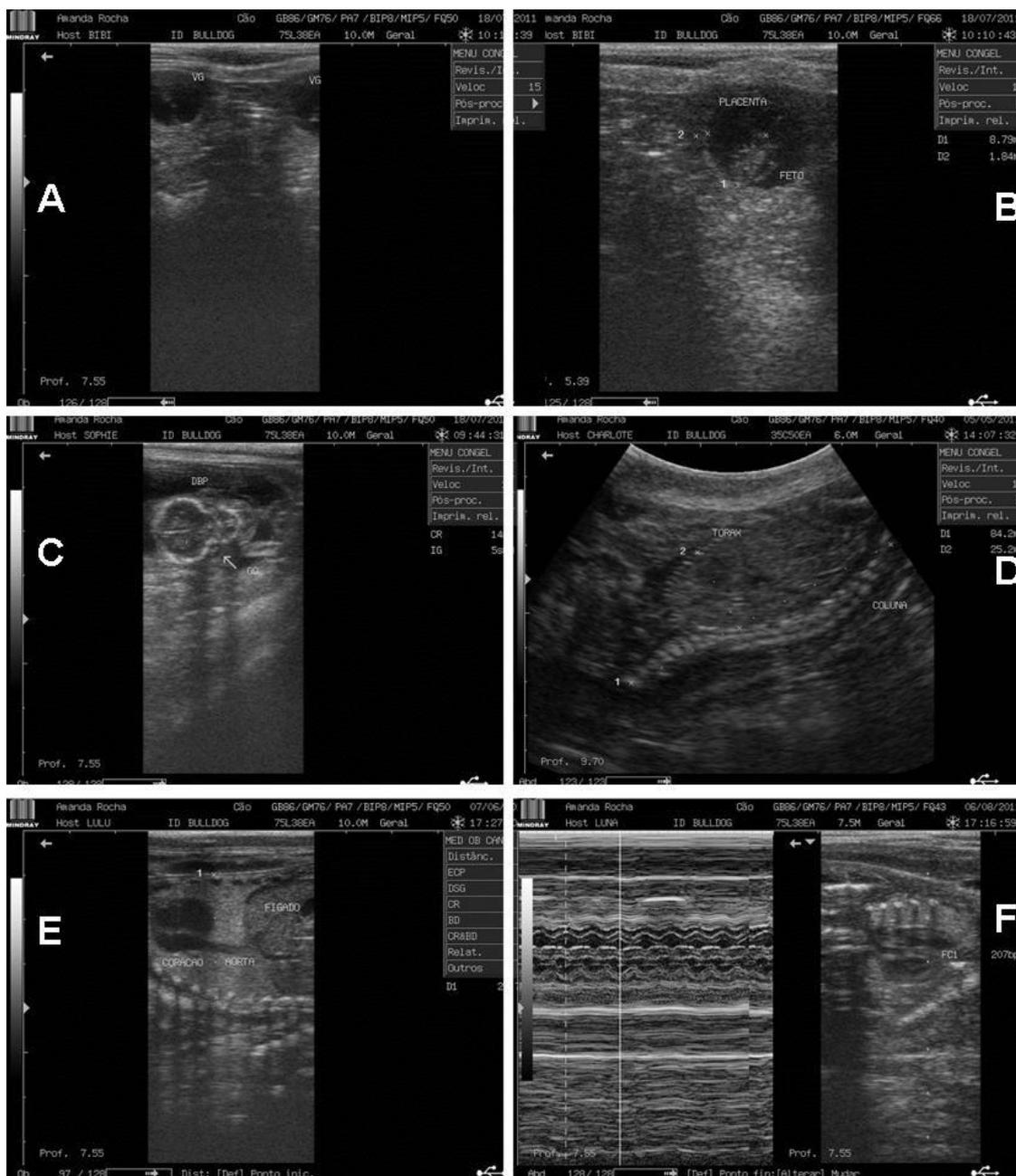


Figura 3. Acompanhamento gestacional ultrassonográfico. Verifica-se desenvolvimento gestacional em diferentes idades: Gestação em terço inicial (quadrante A e B), terço médio (quadrante C e D) e terço final (quadrante E e F).

#### 4.7. Análise estatística

A análise estatística utilizou o programa SAS 2002, para realização da em nível de 5% de confiabilidade, buscando comparar os resultados *in vitro* de cada um dos testes laboratoriais com os índices de gestação das fêmeas inseminadas com a amostra seminal equivalente.

Para análise dos dados obtidos em relação a motilidade, vigor e integridade de membrana, foi utilizada média das variáveis, a análise de variância (ANOVA). Enquanto, no caso do teste de ligação os dados obtidos foram expressos em escores de graduação o que exigiu a utilização do teste qui-quadrado.

O índice de correlação entre cada um dos testes avaliados foi realizado, buscando associar os testes entre si, podendo ser observado que com a proximidade dos valores 1, maior é a significância da correlação entre as variáveis.

#### 4.8. Delineamento experimental

##### 4.8.1. Avaliação 1 – Avaliação do tempo de refrigeração no parâmetro *in vitro* de qualidade seminal em cães.

OBJETIVO: verificar o efeito dos diferentes períodos de refrigeração na qualidade da amostra seminal *in vitro*.

O sêmen fresco, bem como as amostras refrigeradas por 24, 48 e 72 horas, após o reaquecimento foram avaliadas quanto a motilidade e vigor espermático, integridade de membrana e teste de ligação oocitária. As avaliações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente neste

estudo objetivando-se em avaliar a ação do processo de refrigeração no sêmen por diferentes períodos.

#### 4.8.2. Avaliação 2 - Avaliação do tempo de refrigeração do sêmen canino no índice gestacional de cadelas inseminadas artificialmente.

OBJETIVO: verificar o índice gestacional (teste *in vivo*) de cada processamento das amostras.

O sêmen fresco bem como as amostras refrigeradas por 24, 48 e 72 horas, foram utilizadas para inseminação de fêmeas pré-definidas em período ovulatório, como descrito na metodologia deste estudo.

O índice de sucesso foi avaliado de acordo com o número de fêmeas gestantes, e o período gestacional foi acompanhado ultrassonograficamente até o momento do parto.

#### 4.8.3. Avaliação 3 – Correlação entre os testes laboratoriais (*in vitro*) e índices gestacionais (*in vivo*) como parâmetro para predição da qualidade seminal.

OBJETIVO: comparar e correlacionar os resultados de motilidade e vigor espermáticos, integridade de membrana (utilizando-se teste hiposmótico) e teste de ligação oocitária das amostras seminais em diferentes períodos de refrigeração com os índices de gestação das fêmeas inseminadas.

Todas as amostras de sêmen diluído eram pareadas (duas porções idênticas) e submetidas a refrigeração pelo mesmo procedimento e tempo. De acordo com o grupo experimental, as amostras eram reaquecidas e, enquanto

uma delas servia à inseminação artificial da fêmea, a outra foi utilizada para os testes laboratoriais. No caso do sêmen fresco, o mesmo procedimento foi realizado com exceção do processo de refrigeração.

Todos os resultados obtidos em cada uma das avaliações laboratoriais foram correlacionados com os índices de gestação da cadela inseminada com a mesma amostra analisada *in vitro*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Buscando associar o efeito do período de refrigeração com a qualidade da amostra seminal *in vitro*, verificou-se que das 48 amostras seminais analisadas, 12 pertenciam ao grupo controle, não tendo estas sofrido ação de refrigeração, neste caso a qualidade do sêmen manteve-se elevada até o momento da inseminação. Nas 36 amostras restantes verificou-se diminuição das taxas de motilidade, vigor, integridade de membrana e ligação espermática ao oócito, possivelmente pela ação deletéria nas células espermáticas em resposta ao processo de refrigeração. Este resultado foi ainda mais marcante, nas 12 amostras refrigeradas por 72 horas (tabela x).

Quanto a avaliação de motilidade espermática, no início das avaliações (com o sêmen a fresco – grupo controle), verificou-se média de 97% de espermatozoides móveis, o que é um índice alto e próximo ao máximo permitido na análise seminal. De acordo com o período de refrigeração esses valores mostraram-se decrescentes, passando a apresentar médias de 70% de motilidade

às 24 horas de refrigeração, 44% às 48 horas e chegando ao índice bastante baixo de 17% de espermatozóides móveis à análise de 72 horas.

Em relação ao vigor espermático ao longo do período estudado, verificou-se que em média o valor desse parâmetro caiu de índices que tendenciavam ao valor máximo para resultados mínimos possíveis para tal avaliação. No GC verificou-se índices 5 para o vigor, passando ao índice médio de 3 às 24 horas de refrigeração, 2 às 48 horas e atingindo índices 1 no grupo com 72 horas de refrigeração.

Sobre os dados obtidos para integridade de membrana plasmática, utilizando o teste hiposmótico, verificou-se queda progressiva e drástica se comparada a outros estudos da literatura. Inicialmente amostras seminais que apresentavam média de 96% de membranas íntegras, atingiram 71% de integridade às 24 horas, 31% às 48 horas e 13,5% às 72 horas de refrigeração, indicando altos índices de lesões espermáticas provocadas pelo processo de resfriamento.

Acompanhando o mesmo parâmetro, quanto a avaliação do teste de ligação em oócitos homólogos, verificou-se que o número de espermatozóides ligados ao gameta feminino caiu com o processo de refrigeração. Inicialmente, com o sêmen a fresco, verificava-se índice 3 de ligação espermática, o que condiz com valores superiores a 50 espermatozóides ligados por oócito. Ao período de 24 horas obteve-se valores próximos a 2 na graduação estipulada para capacidade ligante do espermatozoide. Estes valores oscilam entre 25 e 50 espermatozóides ligados. Com a evolução do tratamento as 48 e 72 horas, o índice nulos de ligação espermática foi marcante, chegando a atingir graduação 0 para interação entre oócitos e espermatozóides co-incubados. Os valores médios

bem como os desvios padrão de cada variável avaliada em cada tempo de refrigeração podem ser melhor visualizados na tabela 1.

Tabela 1. Valores médios obtidos nas análises seminais de motilidade e vigor espermático, integridade de membrana plasmática e teste de ligação oocitária, em diferentes tempos de refrigeração.

<b>Grupo</b>	<b>Fêmeas (N)</b>	<b>Motilidade (s)</b>	<b>Vigor (s)</b>	<b>Integridade (s)</b>	<b>Ligação (s)</b>
IA com sêmen fresco	12	97.09% <b>a</b> (2.57)	4.66 <b>a</b> (0.49)	96.00% <b>a</b> (2.13)	3.00 <b>a</b> (0)
IA após 24h de refrigeração	12	70.00% <b>a</b> (3.02)	3.00 <b>a</b> (0)	71.17% <b>a</b> (3.18)	2.33 <b>a</b> (0.49)
IA após 48h de refrigeração	12	44.58% <b>b</b> (3.34)	2.33 <b>b</b> (0.49)	31.00% <b>b</b> (3.41)	0.83 <b>b</b> (0.38)
IA após 72h de refrigeração	12	17.92% <b>c</b> (2.57)	1.00 <b>c</b> (0)	13.50% <b>c</b> (2.68)	0 <b>c</b> (0)

Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos neste estudo são inferiores aos verificados em trabalhos semelhantes, que utilizaram também o diluidor a base de leite desnatado, naqueles trabalhos, após 72 horas de refrigeração, o índice de motilidade era de 60%, com vigor 2 e 70% das membranas plasmáticas dos espermatozoides íntegras, aquele estudo porém não realizou nenhum tipo de teste que avaliasse a interação entre oócitos e espermatozoides (CUNHA & LOPES, 2000).

Mendonça (2010) também relatou que em avaliações visando comparar diluidores com gema de ovo ou diferentes concentrações de leite, a queda nos

índices de motilidade espermática e integridade de membrana também mostraram-se menos graves que nos dados obtidos neste estudo, em média, após o período de 72 horas de refrigeração, tais resultados mostravam-se próximos 60% de motilidade espermática e 70% de integridade de membrana, concordando com o estudo Cunha e Lopes (2000).

Nos vários estudos já realizados sobre a refrigeração de sêmen de cão, a motilidade foi muitas vezes considerada um indicador da viabilidade dos espermatozoides e, como tal, era o parâmetro de referência na avaliação da amostra. Na maioria desses estudos, a motilidade da amostra foi avaliada durante 4 dias e os resultados obtidos no 4º dia variaram de 4 a 80%. Esta variação tão ampla pode ser devida a vários fatores, incluindo: diferenças da motilidade da amostra inicial (antes de qualquer processamento); diferenças na composição dos diluidores; diferenças nos métodos de avaliação da motilidade (se objetivos ou subjetivos); e diferenças nos procedimentos de conservação, tais como temperatura ambiental no momento de reaquecimento e análise da amostra, concentração espermática, remoção ou não do fluido prostático (PONGLOWHAPAN *et al*, 2004).

Quanto a avaliação da funcionalidade de membrana uma vez submetida ao teste hiposmótico, sabe-se que as membranas dos espermatozoides são extremamente ricas em ácidos graxos polinsaturados, o que as torna muito susceptíveis à peroxidação lipídica. Este fato é reforçado, quando em condições experimentais os espermatozoides ficam expostos a uma concentração de oxigênio muito superior, comparativamente às suas condições fisiológicas normais (BECCAGLIA *et al*, 2008). A peroxidação da bicamada lipídica das membranas plasmáticas leva a alterações metabólicas e altera as lipoproteínas,

conduzindo à perda parcial ou total da funcionalidade das membranas das células espermáticas (BECCAGLIA *et al*, 2008 e MONTEIRO *et al*, 2009). Os resultados deste estudo sugerem que o diluidor utilizado, nas condições deste experimento, confere proteção às membranas durante o processo inicial da refrigeração. No entanto, de Rota *et al.* (1995) verificaram que em relação ao índice de peroxidação lipídica, o diluidor tris-gema apresentava melhor resultado de proteção quando acrescido ao sêmen.

Os estudos utilizando o teste de ligação como método de avaliação do processamento seminal são restritos para espécie canina, possivelmente pela dificuldade de obtenção dos oócitos e estrutura laboratorial para realização do teste. Dados disponíveis na literatura, por vezes utilizam o teste para comparação de amostras após o processo de congelamento e descongelamento, como o verificado por Ivanova *et al* (1999) que indicou ser este teste um bom parâmetro para definir a qualidade da amostra.

Os testes de ligação oocitária exigem menor tempo para realização do que os testes de fertilização *in vitro* visto que não há a necessidade de maturar o oócito, isso pode tornar-se uma vantagem para avaliação de forma mais rápida de uma amostra seminal. A ligação e penetração do espermatozóide na zona e/ou ooplasma mostrou-se intimamente associada à motilidade espermática (Hay *et al.*, 1997).

Em geral, poucos estudos avaliam os resultados do teste de ligação em comparação com o tempo de refrigeração da amostra, porém os resultados obtidos neste trabalho permitiram verificar que da mesma forma que os outros testes apresentaram queda de resultados com o processo de refrigeração, os índices de espermatozoides ligantes também foram bastante inferiores no período

de 48 e 72 horas de refrigeração, o que pode sugerir a importância desta avaliação na predição da qualidade seminal.

A semelhança de vários estudos realizados em relação ao sêmen canino e sua conservação por refrigeração, no presente estudo, a motilidade e o vigor das amostras diminuíram ao longo do tempo, bem como os índices de integridade de membrana e ligação oocitária. Estes dados sugerem que a refrigeração determina a diminuição do metabolismo espermático e não a quiescência, como é o caso do congelamento, desta forma, o decréscimo de fertilidade verificado pelo aumento do tempo de armazenamento pode ser atribuído a alguns fatores, como o acúmulo de metabólitos, resultantes do metabolismo dos espermatozóides, que podem levar a alterações de osmolaridade e pH no diluidor e que por sua vez têm influência na funcionalidade da célula espermática, acabando por prejudicar a sua função. Outra razão possível é a depleção do substrato energético no meio. Estas hipóteses são reforçadas pelo estudo de Verstegen *et al.* (2005) que observaram que em períodos de refrigeração de até 96 horas, os espermatozóides apresentavam recuperação considerável da motilidade progressiva após substituição do diluidor diariamente. No caso de diluidores à base de leite desnatado, quando preparado com os devidos cuidados, o sêmen de cão diluído e refrigerado, facilmente se mantém viável durante 24 horas e, dependendo da técnica usada, pode permanecer viável durante 5 dias (Feldman & Nelson, 2004). Neste estudo concluímos que os valores médios de todos os testes realizados, apesar de relativamente melhores ao período de 24 horas, seria ainda possível sua utilização após as 48 horas iniciais de refrigeração, apesar dos índices já se apresentarem reduzidos.

.....

Estes dados concordam com os resultados obtidos no momento em que avaliou-se o efeito do mesmo período de refrigeração no índice gestacional das cadelas inseminadas com as amostras seminais. Na inseminação artificial com uso de sêmen refrigerado, a avaliação que possivelmente tenha maior capacidade prever a qualidade da amostra seminal após o reaquecimento é o índice de gestação das fêmeas inseminadas. Como já foi descrito neste estudo, a avaliação de testes *in vivo* são dificultadas pela necessidade de obtenção de um grande número de gestações que possam conferir resultados confiáveis para a avaliação a ser feita.

Neste estudo as fêmeas inseminadas com amostras de sêmen fresco ou refrigerado por 24 horas apresentaram índice de 100% de gestação, desta forma, das 24 fêmeas inseminadas obteve-se 24 gestações positivas. Porém no grupo de fêmeas inseminadas com amostras refrigeradas por 48 horas, 2 das 12 fêmeas utilizadas não apresentaram gestação positiva, indicando média 83% de sucesso de gestação. Em relação ao sêmen refrigerado por 72 horas, verificou-se índice de gestação nulo, ou seja, nenhuma das 12 fêmeas inseminadas concebeu. Esses dados indicam queda significativa na qualidade seminal acompanhado de queda da capacidade fecundante das amostras refrigeradas por 72 horas.

Estudos já demonstraram que a inseminação artificial com sêmen fresco apresenta resultados similares aos obtidos pela monta natural, e que estes podem oscilar entre 85 até 100% de sucesso (DAURIO *et al*, 1987 e PEREIRA *et al*, 2001). No caso desse estudo, o resultado da inseminação com sêmen fresco concorda com esses dados, os índices de sucesso mostraram-se bastante satisfatórios.

.....

Ao se tratar do sêmen refrigerado, autores relatam que cadelas submetidas a inseminação artificial com sêmen refrigerado por 24 e 48 horas, apresentaram índices gestacionais de 100% às 24 horas de refrigeração e 90% às 48 horas (PINTO *et al*, 1999), dados também bastante próximos dos observados neste trabalho. Estes relatos discordam do que preconiza Guérin (1998), pois segundo estes autores a variação entre o sêmen refrigerado por curtos períodos existem se comparados com sêmen fresco, podendo as taxas gestacionais com sêmen refrigerado, mesmo que somente por 24 horas, atingirem média de 70% (100). Outros autores discutem ainda que quanto maior o tempo de refrigeração, pior a qualidade do sêmen após o reaquecimento com conseqüente redução na taxa de gestação positiva após a inseminação, sendo esta alteração verificada principalmente em amostras refrigerada por períodos de 72 e 96 horas, ou mais (SILVA *et al*, 2003).

Estas variações de resultados apresentados na literatura podem estar relacionadas com a diferença no processamento da amostra, bem como da qualidade do sêmen no momento em que foi refrigerado. Além disso, deve-se considerar que o processo gestacional tem total envolvimento da fêmea, o que pode alterar o resultado da avaliação do sêmen.

Com relação ao número de inseminações a ser realizado, Uchoa (2001) e Silva (2002) sugerem a realização de 2 inseminações, em geral com intervalos de 1 dia entre elas. Esse protocolo é recomendado principalmente no caso de inseminações com sêmen fresco ou congelado. Neste estudo optou-se por realizar uma inseminação artificial única, independente do tempo de refrigeração do sêmen, e para seguir o delineamento experimental, no grupo que não sofreu tratamento de refrigeração (sêmen fresco) também foi realizada uma única

inseminação. A princípio, não há indicativos de que os dados obtidos nas inseminações realizadas uma única vez tenham relação com resultados gestacionais negativos, uma vez que Iguer-Ouada (2001) procederam da mesma maneira, realizando inseminações únicas com sêmen refrigerado, e obtiveram índices satisfatórios e semelhantes a este estudo nas primeiras 48 horas, demonstrando ainda resultados de até 50% de gestação mesmo após 11 dias de refrigeração.

Avaliando-se ainda cada um dos testes realizados *in vitro* em comparação com o índice gestacional, de acordo com a correlação estatística existente, verifica-se que a motilidade e vigor espermático, bem como as taxas de integridade de membrana diminuem de acordo com o tempo de refrigeração, e que associado a este resultado as taxas de gestação também se tornam mais baixas com o aumento do período de estocagem do sêmen. No total das 48 fêmeas inseminadas, 34 ficaram gestantes. As amostras seminais utilizadas para inseminação destas fêmeas apresentava, em média: motilidade espermática de 72%, vigor igual ou superior a 3 e porcentagem de membranas plasmáticas integras de 68%. Enquanto as amostras seminais utilizadas nas 14 fêmeas não gestantes apresentavam em média 21% de espermatozóides móveis com vigor 1 e 84% de membranas espermáticas lesadas (tabela 2)

Tabela 2: Médias e desvio padrão de motilidade, vigor e integridade de membranas espermáticas do sêmen de acordo com o resultado de gestação obtida após IA em cadelas.

.....

<b>Gestação</b>	<b>cadelas (N)</b>	<b>Motilidade</b>	<b>Vigor</b>	<b>Integridade</b>
Negativa	14	21.79% <b>a</b>	1.21 <b>a</b>	16.21% <b>a</b>
Positiva	34	72.1% <b>b</b>	3.38 <b>b</b>	68.03% <b>b</b>

Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ).

Em relação as taxas de ligação espermática ao oócito *in vitro*, verificou-se que quanto maior o número de espermatozóides ligados ao oócito, maior o índice gestacional verificado quando a duplicata da amostra foi utilizada para IA. Verificou-se que 70,82% das cadelas gestantes apresentavam índices satisfatórios de ligação espermatozóide-oócito, enquanto índice nulo de ligação espermática em células oocitárias foi associado com resultados de gestação negativos em 12 das fêmeas inseminadas (Tabela 3)

Tabela 3. Número de prenhes positiva de acordo com escore do teste de ligação da amostra seminal utilizada para IA de cadelas.

<b>Ligação</b>	<b>Nº/(%) Fêmeas gestantes</b>	<b>Nº/(%) Fêmeas não-gestantes</b>
0	0 (0%) <b>a</b>	14 (29,16%)
1	10 (20,83%) <b>b</b>	0 (0%)
2	8 (16,66%) <b>b</b>	0 (0%)
3	16 (33,33%) <b>c</b>	0 (0%)

Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ).

Os resultados deste estudo mostram que o índice de gestação positiva das fêmeas inseminadas apresenta alta correlação com a motilidade e vigor espermáticos, integridade de membrana e índice de ligação oocitária, tanto no grupo no qual se utilizou o sêmen fresco como nos diferentes tempos de refrigeração. Da mesma forma os índices gestacionais acompanham os

resultados *in vitro* e ambos decrescem com o prolongamento do período de refrigeração (tabela 4).

Tabela 4. Correlação entre as variáveis analisadas na amostra seminal em relação ao índice de gestação positivas das cadelas inseminadas.

	<b>Motilidade</b>	<b>Vigor</b>	<b>Integridade</b>	<b>Ligação</b>	<b>Gestação</b>
<b>Motilidade</b>	—				
<b>Vigor</b>	0.96**	—			
<b>Integridade</b>	0.98**	0.94**	—		
<b>Ligação</b>	0.96**	0.89**	0.96**	—	
<b>Gestação</b>	0.77**	0.72**	0.72**	0.81**	—

\*\* Valores indicam correlação altamente positiva sobre as variáveis analisadas.

A dificuldade de correlacionar as avaliações *in vitro* com dados *in vivo* são marcantes em pequenos animais, uma vez que estes estudos podem culminar em gestações e filhotes indesejáveis. Apesar da subjetividade dos resultados encontrados, e buscando reduzir número de gestações indesejáveis, inicialmente a microscopia para avaliação de motilidade e vigor espermáticos eram os testes mais comuns a serem utilizados. Ainda que não seja o teste ideal, os resultados desse estudo demonstraram que existe correlação entre as análises laboratoriais e os índices gestacionais em cadelas. Estudos relacionados com outras espécies também concordam com os dados aqui obtidos (KENNEY *et al*, 1975; VILLA *et al*, 2001 e LOVE, 2011).

Na espécie equina, dados resultantes da avaliação por análise computadorizada da motilidade e vigor espermático apresentaram alta correlação com índice gestacional. No mesmo trabalho, o aumento de células espermáticas anormais, e conseqüente queda na qualidade de movimento do espermatozóide também foram associados com declínio da porcentagem de gestantes em primeira estação de monta (LOVE, 2011). Para espécie canina, Mendonça (2010), relatou relação entre a queda da qualidade de motilidade e vigor com o tempo de refrigeração, concordando ainda com os resultados verificados neste estudo, porém no referido estudo testes *in vivo* não foram realizados.

Embora a análise computadorizada (CASA) venha sendo empregada em laboratórios de reprodução animal com resultados satisfatórios quando a veracidade dos dados, neste estudo, devido a necessidade da realização da inseminação artificial e análise das amostras nos testes *in vitro* no mesmo momento, optou-se pela realização apenas das análises subjetivas para motilidade e vigor. A comparação de dados analisados de forma subjetiva e por sistema computadorizado (CASA) já foi avaliado e apresentou boas taxas de correlação entre os dois métodos (KUSTRITZ, 2007). Tais resultados satisfatórios são bons para embasar a utilização de análises subjetivas na rotina da clínica de pequenos animais, tendo em vista que, na realidade, esses são testes de acesso mais simples e barato para o veterinário.

No estudo apresentado, verificou-se correlação alta e significativa entre os índices de integridade de membrana e as taxas gestacionais. Esse resultado corrobora com os resultados encontrados por Brito *et al.* (2003) para a espécie bovina, e sugere que a lesão das membranas espermáticas está realmente relacionada com a baixa fertilidade possivelmente devido a dificuldade de

reconhecimento e ligação à zona pelúcida do oócito. Para que a interação entre os gametas masculinos e femininos se mostre satisfatória, a funcionalidade espermática deve ser mantida o mais próximo de sua totalidade. Sabe-se que as membranas espermáticas são ricas em ácidos graxos polinsaturados, tornando-se muito susceptíveis à peroxidação lipídica que ocorre devido ao envelhecimento e estocagem de sêmen (BRITO et al., 2003). A oxidação das membranas plasmáticas leva a alterações metabólicas e altera as lipoproteínas, conduzindo à perda parcial ou total de sua funcionalidade dado este visto também em membranas espermáticas (BECCAGLIA et al, 2008 E MONTEIRO et al, 2009).

Com relação aos testes de interação entre espermatozóides e oócitos, realizados neste estudo, optou-se pela utilização de oócitos homólogos e recém obtidos de cadelas ovariectomizadas. O teste de ligação oocitária foi escolhido ao invés de testes de penetração ou de fertilização *in vitro*, com objetivo de agilizar o processo de avaliação evitando períodos longos de maturação e fertilização dos oócitos. Relatos do início dos anos 2000 sugeriram que os testes de ligação à zona pelúcida em oócitos previamente preparados podem ser utilizados para avaliar o efeito dos diferentes métodos de tratamento espermático, como por exemplo, o processo de refrigeração seminal sobre a habilidade fertilizante do espermatozóide canino (LARSSON & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2000). No processo de co-incubação entre espermatozóides e oócitos deste estudo, estes dados foram confirmados, uma vez que foi verificada correlação altamente positiva entre o índice de espermatozóides ligados e as taxas de gestação. Resultados semelhantes já foram observados na espécie bovina, onde os testes de ligação e penetração espermática em oócitos homólogos foram apontados como um forte indicativo de fertilidade *in vivo* (VILLA et al, 2000).

## 6. CONCLUSÃO

- O processo de refrigeração por 24, 48 e 72 horas interfere diretamente na qualidade seminal de cães domésticos, reduzindo a qualidade espermática de acordo com o aumento do tempo de refrigeração.

- O processo de refrigeração por 24, 48 e 72 horas interfere diretamente no índice de gestações positivas de cadelas inseminadas com amostras refrigeradas, diminuindo o número de cadelas gestantes após 48h de refrigeração.

- Os testes realizados *in vitro* (motilidade e vigor espermático, funcionalidade de membrana e teste de ligação oocitária) possuem correlação positiva com os índices de gestação de cadelas inseminadas.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y., LEE, D. S., SANO, H., AKIYAMA, K., YANAGIMOTO-UETA, Y. & ASANO, T. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. **J Reprod Dev**, v. 54, n. 4, p.290-294, 2008.

ALLEN, W.E. (1995) Fisiologia do ciclo estral. *In: Allen, W.E. Fertilidade e obstetrícia no cão*. São Paulo: Varela, p. 9-13.

AGARWAL A., SHARMA R.K., NELSON D.R. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. **J Androl**, v. 24, p. 256-267, 2003.

AITKEN R.J. Sperm function tests and fertility. **Int J Androl**, v. 29, p.69 –75, 2006.

AMMAN, R.P., HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **J Androl**, v.14, p.397-406, 1993.

AURICH, C. & SPERGSER, J. (2007). Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p.912-918, 2007.

BECCAGLIA M., ANASTASI P., CHIGIONI S. & G.C., L. Tris-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. **Proceedings of 6<sup>th</sup> International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biennial EVSSAR Congress**, Vienna, Austria, 2008.

BENCHARIF, D., AMIRAT-BRIAND, L., GARAND, A., ANTON, M., SCHMITT, E. & DESHERCES, S. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins). **Anim Reprod Sci**, v. 119, n. 3-4, p.305-313, 2010.

BENETTI, A.H., TONIOLLO, G.H., OLIVEIRA, J.A., Concentrações séricas e progesterona, 17  $\beta$ -estradiol e cortisol durante o final do próestro, estro e diestro gestacional em cadelas. **Revista Ciência Rural - Santa Maria**, v.34, n.2, p.471-478, 2004.

BERGERON, A., CRETE, M. H., BRINDLE, Y. & MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biol Reprod**, v. 70, n. 3, p.708-717, 2004.

BRITO, L.F.C., BARTHA, A.D., BILODEAU-GOESEELSB, S., PANICHB, P.L., KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539–1551, 2003.

BURKE, T.J. Small animal reproduction and fertility. **Proceedings of CBRA Congress**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Brasil, 1991, v.2, p.108-110.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte. 1996.

CHRISTIANSEN, I.J. (1984). **Reproduction in the dog & cat**. São Paulo - Bailliere Trindall, p.270.

CHOULDHRY, T.M., BERGER, T., DALLY, M. In vitro fertility evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative in vivo fertility. **Theriogenology**, v.43. p.1195-1200,1995.

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

CONCANNON, P.W., HANSEL, W., MCENTEE, K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. **Biology of Reproduction**, v. 17, p.604-613, 1977.

CUNHA ICN, LOPES MD. Estudo do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores a base de leite e glicina-gema. **Rev Educ Contin CRMV/SP**, v.3, p.37-42, 2000.

CUNNINGHAM, J. G. (2002). *Textbook of veterinary physiology* (3rd ed.). Philadelphia, Pa.: W.B. Saunders Co.

DAURIO, C.P., GILMAN, M.R., PULLIAM, J.D., SEWARD, R.L. Evaluation of male Beagles and safety of ivermectin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 1755-1760, 1987.

DEPALATIS, L., MOORE, J., FALVO, R.E. Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.52, p.201-07, 1978.

DREVIUS L.O. Spiralization in tails of mammalian spermatozoa in hypotonic media. **Nature**, v. 197, p.1123–1124, 1963.

DREVIUS, L.O., ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Exp Cell Res**, v. 42, p. 136–156, 1966.

EILTS, B.E. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 64, p. 685-691, 2005.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.375-387, 2000.

FAZELI A.R., STEENWEG W., BEVERS M.M., VAN DER BROEK J., BRACHER V., PARLEVLICT J., COLENBRANDER B. Relationship between stallion sperm binding to homologous hemizona and fertility. **Theriogenology**, v. 44, p. 751-760, 1995.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: WB Saunders, 1996. 487p.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A. (2002) Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - Moifopa. *In*: Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, p. 227-260.

FRANKEN D.R., OEHNINGER S., BURKMAN L.J., CODDINGTON C.C., KRUGER T.F., ROSENWAKS Z., ACOSTA A.A., HODGEN G.D. The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in in vitro fertilization (IVF) treatment. **J In Vitro Fert Embryo Transfer**, v. 6, p.44-50, 1989.

FROMAN, D.P., AMANN, R.P., RIEK, P.M., OLAR, T.T. Acrosin activity of canine spermatozoa as a an index of cellular damage. **J. Reprod. Fertil.** v.70, p.301-308, 1984.

GADEA J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v. 63, p.431– 444, 2005.

GADEA J., SELLE´S E., MARCO M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reprod Domest Anim**, v. 39, p. 1-6, 2004.

GREENWALD, G.S., ROY, S.K. (1994). Follicular development and its control. *In*: Knobil, E. e Neill, J.D. *The physiology of reproduction*. New York:Raven Press, 629-708.

GUÉRIN, C. A inseminação artificial na espécie canina. **A Hora Veterinária**, v. 105, p. 25-32, 1998.

HAFEZ, E.S.E. (1995) Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. *In*: Hafez, E.S.E. *Reprodução animal*. São Paulo: Manole, p. 59-94.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Canine spermatozoa – cryopreservation and eva of gamete interaction. **Theriogenology**, v. 48, n. 8, p.1329-1342, 1997.

HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C.W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. **Animal Reproduction Science**. v. 50, p.123-139, 1997.

HEWITT D.A., ENGLAND G.C.W. Manipulation of canine fertility using in vitro culture techniques. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 57, p. 111–125, 2001.

HISHINUMA M., SEKINE J. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, p. 817–820, 2003.

HOFFMAN, B., RIESENBECK, A., KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p.275-288, 1996.

IGUER-OUADA, M. Medically assisted procreation in Canine Species: Analyses and 4 °C preservation of semen. Tese de Doutorado - Université de Liège, Liège, 219p, 2001.

IGUER-OUADA M., VERSTEGEN J.P. Evaluation of the “Hamilton Thorn Computer-Based Automated System” for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.733-749, 2001.

IVANOVA, M., MOLLOVA, M., IVANOVA – KICHEVA, M. G., PETROV, M., DJARKOVA, T.S., SOMLEV, B. Effect of cryopreservation on zona – binding capacity of canine spermatozoa in vitro. **Theriogenology** , v. 52, p.163-170, 1999.

JOHNSTON, S.D., ROOT KUSTRITZ, M.V. & OLSON, P.S (2001). *Canine and feline theriogenology* (1st ed.). Philadelphia, PA: Saunders, 592p.

KASTELIC J.P., THUNDATHIL J.C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reprod Domest Anim**, v. 43, n. 2, p.368 –373, 2008.

KAWAKAMI E, HORI T, TSUTSUI T. Changes in semen quality and in vitro sperm capacitation of semen collection in dogs with both asthenozoospermia and teratozoospermia. **J Vet Met Sci**, v. 60, p.607–614, 1998.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W.. Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. *In: Annual convention American Association Equine Practitioners*, v. 21, p.327, 1975.

KUMI-DIAKA J. Subjecting the canine spermatozoa to the hypoosmotic swelling test. **Theriogenology**, v 39, p.1279–1289, 1993.

KUMI-DIAKA J., BADTRAM G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. **Theriogenology**, v, 41, p.1355–1366, 1994.

LARSSON, B., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 327-336, 2000.

LEWIS S.E.M. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? **Reproduction**, v. 134, p.31– 40, 2007.

LOPES, G., SIMOES, A., FERREIRA, P., MARTINS-BESSA, A. & ROCHA, A. Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. **Anim Reprod Sci**, v. 112, n. 1-2, p.158-163, 2009.

LOVE, C.C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**, v.76, p.547-557, 2011

MANJUNATH, P., NAUC, V., BERGERON, A. & MENARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol Reprod**, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.

MASTROMONACO, G.F., HAY, M.A., GOODROWE, K.L. The effect of oocyte storage and Cumulus cell presence on canine zone penetration by domestic dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p. 1123-1134, 2002.

MENDONÇA, R.A.B. Características de sémen canino refrigerado - comparação entre três diluidores diferentes. Tese de doutorado - Universidade de Lisboa, Lisboa, 91p, 2010.

MICHAEL, A. J., ALEXOPOULOS, C., PONTIKI, E. A., HADJIPAVLOU-LITINA, D. J., SARATSI, P. & VERVERIDIS, H. N. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v. 112, n. 1-2, p.119-135, 2009.

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.

MONTEIRO, J. C., GONCALVES, J. S., RODRIGUES, J. A., LUCIO, C. F., SILVA, L. C. & ASSUMPCAO, M.E. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. **Reprod Domest Anim**, v. 44, n. 2, p. 359-362, 2009.

OLAR, T.T., BOWEN, R.A., PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v. 31, p.451-461, 1989.

O'MEARA C.M., HANRAHAN J.P., PRATHALINGAM N.S. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 69, p.513–522, 2008.

PALOMO, M. J., FERNANDEZ-NOVELL, J. M., PENA, A., GUINOVRT, J. J., RIGAU, T. & RODRIGUEZ-GIL, J. E. Glucose- and fructose-induced dog-sperm glycogen synthesis shows specific changes in the location of the sperm glycogen deposition. **Mol Reprod Dev**, v. 64, n3, p.349-359, 2003.

PEÑA-MARTINEZ A.I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 209-224, 2004.

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.

PEREZ-LLANO, B., LORENZO, J.L., YENES, P., TREJO, A., GARCIA-CASADO, P. A short hyposmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenology** v.56, p.387-398, 2001.

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

PINTO, C. R., OZINK, D. M. Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v. 104, n. 2-4, p.450-455, 2008.

PONGLOWHAPAN, S., ESSEN-GUSTAVSSON, B. & LINDE FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, v. 62, n.8, p.1498-1517, 2004.

PONGLOWHAPAN, S., CHATDARONG, K., SIRIVAIIDYAPONG, S. & LOHACHIT, C. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. **Theriogenology**, v. 66, n.6-7, p.1633-1636, 2006.

REVEL, S.G., MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Anim. Reprod. Sci.** v.36, p.77-86, 1994.

RIGAU, T., FARRE, M., BALLESTER, J., MOGAS, T., PENA, A. & RODRIGUEZ-GIL, J. E. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. **Theriogenology**, v. 56, n.5, p. 801-815, 2001.

RIGAU, T., RIVERA, M., PALOMO, M. J., FERNANDEZ-NOVELL, J. M., MOGAS, T. & BALLESTER, J. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. **Reproduction**, v. 123, n.4, p. 579-591, 2002.

RIJSSELAERE T., VAN SOOM A., TANGHE S., CORYN M., MAES D., DE KRUIF A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**, V. 64, p. 706–719, 2005.

ROOT KUSTRITZ, M.V. The value of canine semen evaluation for practitioners. **Theriogenology**, v. 68, n.3, p. 329-337, 2007.

ROTA, A., STROM, B. & LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 degrees C. **Theriogenology**, v. 44, n.6, p. 885-900, 1995.

SÁNCHEZ-PARTIDA L.G., WINDSOR D.P., EPPLESTON J. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **J Androl**, v. 20, p.280–288, 1999.

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., UCHOA, D.C. SILVA, L.D.M. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **Vet Journal**, v. 164, n.3, p.244-246, 2002.

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Main aspects for the accomplishment of artificial insemination in canine species. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, p. 53-60, 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, 2002.

SILVA, L.D.M., SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S. (2002) Inseminação artificial em cães. *In: Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São Paulo: Varela, p. 69-96.

SPITTALER, P.J.; TYLER, J.P.P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity of spermatozoal membrane. **Clin Reprod Fertil**, v.3, p.187-190, 1985.

STROM HOLST, B., LARSSON, B., LINDE-FORSBERG, C. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucid binding assay. **J Reprod Fertil**, v. 119, n.2, p. 201-206, 2000a.

STROM HOLST, B., LARSSON, B., LINDE-FORSBERG, C. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. **J Reprod Fertil**, v. 119, n.1, p. 77-83, 2000b.

STROM HOLST, B, LARSSON, B, RODRIGUES-MARTINEZ, H, LAGERSTEDT, A.S., LINDE-FORSBERG, C. Zona pellucida binding-assay: a method for evaluation of canine spermatozoa. **J Reprod Fertil Suppl** , v. 57, p.137–140, 2001.

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.

VAN DER VEN, H.H., JEYENDRAN, R.S., AL-HASANI, S., PEREZ-PELAEZ, M., DIEDRICH, K., ZANEVELD, L.J. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. **J. Androl.** v. 7, p. 190–196, 1986.

VERSTEGEN, J.P., ONCLIN, K. & IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v. 64, n.3, p. 720-733, 2005.

VIANA J.H.M. & BOLS, P.E.J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, n. 1, p.1-4, 2005.

VILLA, R.A., FERNANDES, M.B., ACCORSI, M.F., GALERANI, M.A., LÔBO, R.B. Avaliação da fertilidade in vitro do sêmen congelado de touros da raça Caracu. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.25, p.390-392, 2001.

VOLPE, S., LEOCI, R., AIUDI, G. & LACALANDRA, G.M. Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. **Reprod Domest Anim**, v.44, n.2, p.275-278, 2009.

WITTE, T.S., SCHAFFER-SOMI, S., KUCHAR, A., MOSTL, E., IBEN, C. & AURICH, C. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v. 110, n. 3-4, p.293-305, 2009.