

**APERFEIÇOAMENTO DOS PROTOCOLOS DE COLETA E
TECNOLOGIA DE SÊMEN DE CÃES (*Canis lupus familiaris*,
LINNAEUS, 1758) SUBMETIDOS À ELETROEJACULAÇÃO**

ISRAEL PEREIRA DOS SANTOS

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO, 2011**

**APERFEIÇOAMENTO DOS PROTOCOLOS DE COLETA E
TECNOLOGIA DE SÊMEN DE CÃES (*Canis lupus familiaris*,
LINNAEUS, 1758) SUBMETIDOS À ELETROEJACULAÇÃO**

ISRAEL PEREIRA DOS SANTOS

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

Orientador: Prof^a. Isabel Candia Nunes da Cunha

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO, 2011

**APERFEIÇOAMENTO DOS PROTOCOLOS DE COLETA E
TECNOLOGIA DE SÊMEN DE CÃES (*Canis lupus familiaris*,
LINNAEUS, 1758) SUBMETIDOS À ELETROEJACULAÇÃO**

ISRAEL PEREIRA DOS SANTOS

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

Aprovada em 29 de julho de 2011.

Comissão examinadora:

Prof^a. Fabiana Ferreira de Souza (Doutora, Reprodução Animal) - UNIFRAN

Prof^o. Valéria Amorim Conforti (Doutora, Ciência Animal) – Instituto Pró-Carnívoros

Prof^a. Fernanda Antunes (Doutora, Medicina) - UENF

Prof^a. Isabel Candia Nunes da Cunha-orientadora (Doutora, Reprodução Animal)-UENF

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA/UENF** 082/2011

Santos, Israel Pereira dos

Aperfeiçoamento dos protocolos de coleta e tecnologia de sêmen de cães (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) submetidos à eletroejaculação / Israel Pereira dos Santos. - 2011.

71f. : il.

Orientador: Isabel Candia Nunes da Cunha

Tese (Doutorado - Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Eletroejaculação 2. Dor 3. Cão 4. Sêmen 5. Resfriamento I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 636.7082

*Ser Fluminense não é ser melhor, mas ser certo. Não é vencer a qualquer preço, mas
vencer-se
primeiro para ser vitorioso depois.*

(trecho do poema de Artur da Távola – Ser Fluminense)

À minha família

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense, pelo curso de Pós-graduação em Ciência Animal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro durante a execução do projeto.

À professora Isabel Candia Nunes da Cunha, pela orientação e por proporcionar a oportunidade de trabalhar com reprodução de carnívoros.

Aos professores Fernanda Antunes e José Frederico Straggiotti Silva, que me ajudaram com as questões burocráticas e práticas da rotina na universidade, durante o pós-doutoramento da minha orientadora.

Às funcionárias da coordenação da pós-graduação em Ciência Animal, Jovana e Conceição, pela presteza e eficiência na assistência aos alunos do programa.

Ao técnico Luis, do laboratório de eletrônica / CCT, pela aferição do eletroejaculador.

À Mônica Luz, pela ajuda nas primeiras castrações.

Ao Prof. Antonio Albernaz e ao técnico Josias Machado, pela colaboração nas análises clínicas da urina.

Aos funcionários do HVET/UENF, Marília, Evaldo, Filomena e Mica, que, no exercício de suas profissões, colaboraram com o andamento do trabalho.

À diretoria do CCZ Campos, por ceder os cães; e aos funcionários daquela instituição, Maria do Parto e Áureo, pela presteza e paciência.

À Carolina Montes Silva, pela preciosa colaboração durante o experimento do resfriamento do sêmen.

Ao Doutor Osvaldo de Almeida Resende, pela contribuição na análise dos dados.

Aos veterinários do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA): Márcia Faes, Fausto Paes de Carvalho e Carla Sobrinho Paes de Carvalho, pelo auxílio técnico. Aos demais alunos, técnicos e funcionários do LRMGA que contribuíram direta ou indiretamente para o meu trabalho.

Aos proprietários dos cães, que abriram as portas das suas casas e permitiram que eu coletasse o sêmen dos seus cães.

Finalmente, agradeço o auxílio técnico indispensável dos meus colegas e amigos Cristina Leite Francisco Gualberto Ramos, José Leonardo Gualberto Ramos, Priscilla Carla Santos Costa e Rodrigo Fortunato Oliveira, sem os quais este trabalho não seria realizado com tanta qualidade. Muito obrigado!

BIOGRAFIA

ISRAEL PEREIRA DOS SANTOS, filho de Cláudio César dos Santos e Denise Ferreira Pereira, nasceu em 11 de agosto de 1979, na cidade de Brasília-DF.

Concluiu o curso técnico em Agropecuária no Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em Seropédica-RJ, no ano de 1997, e o curso de Medicina Veterinária na UFRRJ, em 2004. Durante a graduação, foi monitor das disciplinas Fisiologia da Reprodução e Inseminação Artificial, no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, além de ser Bolsista da Prefeitura do Rio de Janeiro, no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman.

É mestre em Produção Animal / Biotecnologia da Reprodução pela Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Em agosto de 2007, iniciou o doutorado em Ciência Animal / Biotecnologia da Reprodução, na UENF, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2011.

CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	20
3. DESENVOLVIMENTO	21
3.1. ARTIGO I.....	22
Eficiência da associação entre a PGF2α e o feromônio sexual 4-metil	
hidroxibenzoato usados previamente à eletroejaculação em cães	22
Resumo	22
1. Introdução.....	23
2. Materiais e Métodos	24
3. Resultados.....	28
4. Discussão	32
Referências bibliográficas.....	35
3.2. ARTIGO II.....	39
A combinação da cetamina com a xilazina é capaz de evitar a dor durante a	
eletroejaculação em cães	39
Resumo	39
Introdução.....	39
Materiais e métodos	41

Resultados	44
Discussão	44
Referências bibliográficas	46
3.3 ARTIGO III.....	49
Resfriamento do sêmen canino previamente contaminado por urina.....	49
Resumo	49
Introdução.....	50
Materiais e métodos	51
Resultados.....	54
Discussão	56
Conclusões	57
Referências bibliográficas.....	58
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE ABREVIACOES

CASA – Computer-assisted semen analysis

μ L – microlitro

μ m/s – micrmetros por segundos

mM – milimolar

mOsmol/l – miliosmis por litro

VAP – Velocidade do trajeto

VSL – Velocidade progressiva

VCL – Velocidade curvilinear

ALH – Amplitude lateral da cabeça

BCF – Frequência dos batimentos da cauda

STR – Retilinearidade

LIN – Linearidade

Hz – hertz

RESUMO

SANTOS, Israel Pereira dos. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; agosto de 2011; Aperfeiçoamento dos protocolos de coleta e tecnologia de sêmen de cães (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) submetidos à eletroejaculação; Professora orientadora: Isabel Candia Nunes da Cunha.

A presente tese, dividida em três artigos, trabalhou com as questões relacionadas à eletroejaculação em cães. Experimento I - testou-se um protocolo de eletroejaculação com um aparelho desenvolvido especificamente para este projeto, quando os cães eletroejaculados receberam um estímulo sexual sensorial (metil 4-hidroxibenzoato) e farmacológico (dinoprost trometamina) previamente à eletroejaculação. Os resultados deste primeiro experimento demonstram que a estimulação prévia dos cães apresentou melhor motilidade total (43%) em relação aos cães que não foram estimulados previamente à eletroejaculação (10%). Experimento II - avaliou as variáveis relacionadas à dor nos cães eletroejaculados, após anestesia com a combinação de cetamina e xilazina: frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corporal. Nenhuma das variáveis indicativas da dor aumentou durante a eletroejaculação. Experimento III – realizou-se um ensaio em que o sêmen canino foi contaminado com diferentes concentrações por urina, pois a contaminação por urina é frequente em animais submetidos à eletroejaculação. As concentrações de urina utilizadas foram 0, 3, 6, 13, 25 e 50% em ringer simples. Observou-se que as concentrações de urina >13% foram prejudiciais aos espermatozóides incubados em banho-maria por 20 minutos. Entretanto, os espermatozóides contaminados por urina foram resfriados em um diluidor

à base de leite, o que permitiu ao sêmen contaminado com uma concentração $\leq 25\%$ ser resfriado por até 24h a 5°C. Conclui-se que: 1) o estímulo sexual sensorial e farmacológico melhora a motilidade espermática do sêmen obtido pela eletroejaculação em cães; 2) que a combinação do protocolo anestésico que utiliza cetamina e xilazina associado ao uso de um eletroejaculador emissor de ondas sinoidais não causa dor aos cães; e, 3) finalmente, que a concentração máxima de urina compatível com o resfriamento do sêmen em um diluidor à base de leite é $\leq 25\%$ para um resfriamento a 5°C por até 24h.

Palavras-chave: eletroejaculação, dor, cão, sêmen, resfriamento.

ABSTRACT

SANTOS, Israel Pereira dos. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; August, 20011; Improvement of semen collection protocols in dogs (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) via electroejaculation; Major Advisor: Professor Isabel Candia Nunes da Cunha.

In this dissertation the questions related to electroejaculation in dogs are described. Experiment I - one protocol using one machine made only for this project was tested when dogs electroejaculated received previous sensorial (methyl 4-hydroxybenzoate) and pharmacological (dinoprost tromethamine) stimuli prior to semen collection. Results suggest that previous stimuli improved semen motility (43%) compared to those dogs that did not received any previous stimuli (10%). Experiment II – this one assessed pain in dogs electroejaculated, after anesthesia with ketamine plus xylazine: heart frequency, respiratory frequency and body temperature. None of the variables increased during electroejaculation, suggesting that the dogs did not experience pain during electroejaculation. Experiment III - an assay with semen contaminated using different urine concentrations was performed, because urine contamination is a frequent event that happens during the electroejaculation in dogs. Urine concentrations used were 0, 3, 6, 13, 25, and 50% in Ringer's solution. Results indicated that urine concentrations >13% were harmful to sperm incubated in water-bath for 20 minutes. However, the sperm contaminated by urine could be cooled for 24 hours at 5°C after pre-dilution with milk based extender. In conclusion: 1) sensorial and pharmacological stimuli previous to electroejaculation improve sperm motility in dogs; 2) the association between anesthetic

protocol and sine waves applied to dogs during electroejaculation avoids pain in those animals; And 3) the highest concentration of urine suitable to semen cooling in milk extender at 5°C during at least 24h, is $\leq 25\%$.

Key words: electroejaculation, pain, dog, semen, cooling,

1. INTRODUÇÃO

A coleta do sêmen de cães é realizada comumente pela técnica de massagem peniana, pois esta é de fácil execução e nem sempre são necessários o condicionamento prévio do cão ou a presença de uma cadela no cio (KUTZLER, 2005). Porém, outros métodos podem ser utilizados para a coleta de sêmen de cães e de outros canídeos como, por exemplo, vagina artificial e eletroejaculação (OHL et al., 1994; GOODROWE et al., 1998; KUTZLER, 2005; MINTER e De LIBERTO, 2005).

Embora a eletroejaculação não seja o método de escolha para a coleta do sêmen de cão doméstico, as biotécnicas aplicadas à reprodução animal desenvolvidas para o cão podem servir de modelo para protocolos utilizados em outros canídeos em vias de extinção, como é o caso do Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). Mascarenhas et al. (2007) afirma que o lobo-guará também ejacula em três frações como o cão doméstico. Contudo, não há um protocolo eficiente de eletroejaculação, determinado para ambas as espécies, que permita a coleta de sêmen de qualidade adequada à congelação, pois a contaminação por urina é frequente durante a coleta, além da variação individual quanto à resposta aos estímulos elétricos para a eletroejaculação (CUNHA et al., 2008).

Ejaculação

É a expulsão do fluido seminal pelo meato urinário. É dividida em duas fases: emissão e expulsão. No homem, é associada ao orgasmo e a estímulos subjetivos; nos ratos, é associada à recompensa (COOLEN, 2004).

O controle da ejaculação é feito pelo sistema nervoso autônomo e motor. A emissão envolve respostas parassimpáticas, como a emissão de fluidos de células epiteliais e glândulas acessórias sexuais, e respostas simpáticas, que levam o fluido seminal até próximo à uretra, controlado pelo nervo hipogástrico (ARAI et al., 2003). Já a expulsão é uma fase não completamente entendida, que, com os conhecimentos atuais, entende-se envolver respostas simpáticas e motoras, dentre estas, contrações rítmicas dos músculos perineais e do músculo bulbocavernoso (COOLEN, 2004), como também o músculo isquiocavernoso, inervado pela cadeia simpática lombossacral via nervo pudendo (ARAI et al., 2003).

A uretra membranosa do cão tem duas camadas musculares e é internamente composta de músculo liso, e externamente orientada circularmente, constituída de músculo estriado. Este por sua vez é inervado predominantemente pelo sistema nervoso simpático (ARAI et al., 2003).

As contrações dos músculos responsáveis pela expulsão do sêmen são controladas por um sistema de arco-reflexo, que tem o controle principal encontrado na medula espinhal (SONKSEN e OHL, 2002). Para Arai et al. (2003), quando um animal anestesiado é submetido à coleta de sêmen por eletroejaculação, não é necessária a participação do arco-reflexo para que a fase da ejaculação compreendida pela expulsão seja alcançada.

Os órgãos viscerais envolvidos na ejaculação recebem estímulos vindos de fibras nervosas aferentes do sistema nervoso simpático e parassimpático, que no homem, têm origem nos neurônios pré-ganglionares localizados na coluna de células intermediolateral (IML) e no núcleo autônomo dorsal central (DCN) dos segmentos infratorácico e supralombar (T13-L2). No homem, o processo da

emissão do sêmen ocorre em conjunto com o fechamento do colo da bexiga e contração das glândulas vesiculares, próstata e ductos deferentes (COOLEN, 2004). Nos cães, o fechamento do colo da bexiga é comandado pelo sistema nervoso simpático, que age sobre os receptores α_2 -adrenérgicos (KIMURA et al., 1975; REECE, 1996). A estimulação da inervação simpática promove forte contração dos ductos deferentes e, conseqüentemente, promove o transporte dos espermatozoides e do fluido epididimário em direção à uretra (COOLEN, 2004). Entretanto, existe uma inervação cruzada nos nervos esplênicos lombares que levam estímulos tanto para a bexiga, como para os ductos deferentes e próstata (ARAI et al., 2003).

Estímulos sensoriais, como de feromônios sexuais, secretados por uma cadela no estro (GOODWIN et al., 1979) ou de origem sintética, como o metil 4-hidroxibenzoato (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, cód. H5501) podem aumentar a quantidade de sêmen obtido pelo estímulo manual do pênis (KUTZLER, 2005; KUSTRITZ e HESS, 2007). Alguns fármacos, como a prostaglandina F2-alfa (PGF2-alfa), podem aumentar o volume do ejaculado, pois aumentam a contração da musculatura lisa responsável pela emissão do sêmen (HESS, 2006; KUSTRITZ e HESS, 2007).

Eletroejaculação

É uma técnica que permite a coleta do sêmen utilizando-se estímulos elétricos (OHL et al., 2008). Uma probe elétrica é introduzida no reto do animal e os três eletrodos são dispostos paralelamente no sentido longitudinal da probe, em contato com a parede retal, posicionados sobre a próstata. Existem diferentes protocolos com diferentes números de estímulos e voltagens que variam de 2-80V (BRINDLEY, 1981), mas Sonksen e Ohl (2002) indicam que a amperagem deve ser mantida em 100mA durante os estímulos elétricos. O protocolo mais utilizado para a coleta do sêmen de carnívoros é o descrito por Wildt (1983), que consiste de 80 estímulos, divididos em três séries de estímulos que vão de 2-5V, com

intervalo de 5 minutos entre as séries (MINTER e DeLIBERTO, 2005; JOHNSTON et al., 2007; CUNHA et al., 2008).

Para a execução do protocolo de eletroejaculação,   necessária a contenção química dos animais, que pode ser realizada por anestésicos, como o Zoletil[®] (tiletamina e zolazepam), 5mg/kg (CAZES, 2006; CUNHA et al., 2008); como também a associação entre Quetamina e Xilazina (MINTER e DeLIBERTO, 2005; JOHNSTON et al., 2007).

Os estímulos elétricos não devem ser contínuos, pois pode ocorrer o aquecimento da mucosa retal. Ohl et al. (2008) afirmam que, na coleta no homem, os estímulos devem ser descontinuados quando não ocorre mais ejaculação ou se a temperatura da probe exceder a 38,5 C. Para contornar o problema do aquecimento, são utilizadas frequências que variam de 5-140 estímulos por minuto (BRINDLEY, 1981).

Contaminação do s men por urina

A estreita relação do sistema urinário com o sistema reprodutor permite que o sêmen entre em contato com a urina, em algumas ocasiões, como resultado de mecanismos fisiológicos, patológicos ou pela técnica de coleta de sêmen. Tanto a micção, quanto a ejaculação retrógrada, quando o sêmen flui em direção   bexiga, são importantes eventos que ocorrem durante o processo de eletroejaculação nos canídeos (OHL et al., 1994; GOODROWE, 1998; ROMAGNOLI, 1999; CAZES, 2006).

A contaminação por urina também ocorre no homem, por causas patológicas ou durante a eletroejaculação em paraplégicos. Os avanços no desenvolvimento de técnicas para a utilização do sêmen humano contaminado com urina foram feitos a partir dos estudos de Crich e Jequier (1978) e Makler et al. (1981), quando avaliaram métodos de lavagem do sémen para utilização nos processos de inseminação artificial.

Desde 2005, desenvolve-se, no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal da UENF, uma linha de pesquisa que visa a estudar os efeitos deletérios da urina sobre o espermatozóide canino (SANTOS, 2007), pois observamos a frequente contaminação de urina nas coletas de sêmen de lobo-guará por eletroejaculação, durante a tentativa de criopreservar o sêmen deste animal ameaçado de extinção, para contribuir com o Plano Nacional de Manejo do Lobo-guará. Esta pesquisa está baseada em estudos semelhantes relacionados à contaminação do sêmen por urina que foram desenvolvidos para a espécie equina (GRIGGERS et al., 2001) e para os humanos (CRICH e JEQUIER, 1978; MAKLER et al., 1981).

Outro tema relevante observado em trabalhos anteriores de nossa equipe é a dor. Cazes (2006) declara que “Em relação à analgesia, a equipe, de forma empírica, classificou o procedimento de eletroejaculação em cães mantidos em plano anestésico pela anestesia inalatória com isoflurano após a indução com Zoletil (tiletamina + zolazepam) como sendo mais confortável para o animal, quando comparado ao protocolo 1 (somente Zoletil)”.

Para responder às questões científicas ligadas ao tema central da tese, foram elaborados três artigos apresentados no mesmo formato que são submetidos às revistas.

2. OBJETIVOS

- Avaliar os efeitos da associação da PGF2-alfa e da combinação dos anestésicos quetamina/xilazina, utilizados na contenção química dos animais durante a eletroejaculação.
- Avaliar a eficiência do estímulo prévio da emissão seminal com feromônio associado à PGF2-alfa, sobre a eletroejaculação, quando as variáveis macroscópicas (volume e aspecto), microscópicas (motilidade, vigor e concentração) e físico-químicas (pH e osmolaridade) do sêmen; bem como a direção da expulsão do sêmen (ejaculação antrógrada ou retrógrada) foram utilizadas como parâmetro da eficiência da eletroejaculação.
- Verificar se a anestesia dos animais com a combinação de quetamina e xilazina, mais o uso de estímulos elétricos com baixa tensão/corrente, é capaz de evitar que os animais sintam dor durante a eletroejaculação.
- Estudar os efeitos do resfriamento sobre o sêmen submetido previamente a diferentes concentrações de urina diluída em ringer simples.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. ARTIGO I

(Apresentado no formato da revista Theriogenology)

Eficiência da associação entre a PGF2 α e o feromônio sexual 4-metil hidroxibenzoato usados previamente à eletroejaculação em cães

I.P. Santos^a, C.L.F.G. Ramos^a, J.L.G. Ramos^b, R.F. Oliveira^a, I.C.N. Cunha^a.

^a Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

^b Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, Espírito Santo, Brasil.

Resumo

A eletroejaculação é uma técnica que pode ser utilizada na coleta do sêmen de canídeos, mas o seu uso neste grupo de animais é restrito, pela baixa taxa de sucesso e baixa qualidade do sêmen. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da PGF2 α e o 4-metil hidroxibenzoato sobre a ejaculação. Para tanto, foram utilizados 20 cães, sem raça definida, com peso entre 5,3-22,2kg, divididos em dois grupos (n=10 animais por grupo): 1) mantidos na presença de uma fêmea castrada por 10 minutos antes da eletroejaculação; 2) mantidos na presença da mesma fêmea castrada com a vagina impregnada por feromônio sintético metil 4-hidroxibenzoato por 10 minutos e após, receberam uma aplicação IM de Dinoprost Trometamina (Lutalyse[®], Pfizer, Brasil), 0,1mg•kg⁻¹. Após este período, todos os cães foram contidos quimicamente com Cloridrato de Cetamina (Cetamin[®], Syntec, Brasil), 8mg kg⁻¹ IM; e Cloridrato de Xilazina (Xilazin[®], Syntec, Brasil), 1mg•kg⁻¹ IM, e submetidos ao protocolo de eletroejaculação. O desempenho dos dois protocolos foi avaliado pelas variáveis clínicas de ejaculação (antrógrada ou retrógrada) e seminais (aspecto, cor, volume, motilidade, vigor, pH e

osmolaridade). Obtivemos 80% e 100% de ejaculação antrógrada nos Grupo 1 e 2, respectivamente. A motilidade espermática diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre os grupos 1 e 2 ($10,1 \pm 4,5$ vs $43,0 \pm 8,3$, respectivamente). Conclui-se que o protocolo de eletroejaculação adotado foi eficiente, e que a $\text{PGF2}\alpha$ associada ao estímulo sensorial sexual pode melhorar a qualidade do sêmen em cães submetidos ao procedimento.

Palavras-chaves: eletroejaculação, $\text{PGF2}\alpha$, sêmen, cão.

1. Introdução

A coleta do sêmen de cães é realizada comumente pela técnica de massagem peniana, pois esta é de fácil execução e nem sempre são necessários o condicionamento prévio do cão ou a presença de uma cadela em cio [1]. Outros métodos utilizados para a coleta de sêmen de canídeos incluem a vagina artificial e o eletroejaculador [1,2,3,4,5]. Embora a eletroejaculação não seja o método de escolha para a coleta de sêmen do cão doméstico, as biotécnicas reprodutivas desenvolvidas para o cão podem servir de modelo para protocolos utilizados em canídeos em vias de extinção [4].

Durante a eletroejaculação, é necessária a contenção química dos animais, que pode ser realizada com a associação de tiletamina e zolazepam [3,6], o halotano [2], a associação entre a cetamina e a xilazina [4], e a associação de cetamina, medetomidina e atropina [7].

A dificuldade frequentemente encontrada durante a coleta de sêmen de canídeos pela eletroejaculação é a baixa qualidade do sêmen, seja pela pouca quantidade de células obtidas ou mesmo pela baixa motilidade. Um problema secundário relacionado a esta técnica é a frequente contaminação do ejaculado por urina [6].

Na busca por melhores resultados na coleta de sêmen, alguns autores indicam a aplicação de hormônios e neurotransmissores que aumentem a libido do macho

[8, 9], participem do processo de ejaculação [10] ou a motilidade do sêmen [11,12,13].

A prostaglandina F2-alfa (PGF2 α) pode aumentar o volume do ejaculado, pois aumenta a contração da musculatura lisa responsável pela emissão do sêmen [14,15]. Estímulos sensoriais de feromônios sexuais, secretados por uma cadela no estro ou de origem sintética, como o metil 4-hidroxibenzoato [16], também podem aumentar a quantidade de sêmen obtido durante a coleta por meio de estímulo manual do pênis [1, 15].

O objetivo deste trabalho foi utilizar a associação de estímulos sensoriais e hormonais, previamente à contenção química, para aumentar a eficiência da eletroejaculação em cães. O desempenho dos dois protocolos foi avaliado pelas variáveis clínicas de ejaculação e seminiais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados 20 cães sem raça definida e sem alteração clínica aparente e considerados aptos à coleta de sêmen por eletroejaculação. Os cães foram levados semanalmente, em grupos de 04 animais, ao Hospital Veterinário, e cada animal passou por uma avaliação clínica (inspeção visual externa, avaliação do escore corporal, pesagem, palpação abdominal, avaliação das mucosas, ausculta cardiopulmonar e aferição da temperatura retal) e ultrassonográfica abdominal e testicular, antes da realização do procedimento. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais /UENF (protocolo número 67/2009) e realizado no verão 2009/2010, no período de novembro a março.

A adaptação dos animais foi realizada em três dias, durante os quais estes foram alojados em gaiolas individuais. Nos dois primeiros dias, os animais receberam ração (BillDog Premium[®], Extrutecnica, Brasil), duas vezes ao dia, e água à

vontade. No terceiro dia, foi implantado o regime de jejum pré-anestésico, e os cães foram submetidos ao protocolo de eletroejaculação.

2.2. Coleta do sêmen

As coletas foram realizadas no ambulatório da clínica reprodutiva de pequenos animais do HV-UENF, com temperatura ambiente controlada de $\pm 23^{\circ}\text{C}$. O eletroejaculador (Santa Lydia Laboratórios – Brasil) foi fabricado sob as seguintes especificações: voltagem 0-10,9V, corrente de 100 e 200 mA, ondas senoidais com frequência de 50 e 60 Hz, probe com dois eletrodos longitudinais paralelos de 8 cm de comprimento; comprimento total da probe de 25,4cm e diâmetro de 1,6cm, similar ao previamente descrito [2,5].

Antes de iniciar a eletroejaculação, os cães foram divididos em dois grupos, cada qual recebeu um tratamento sensorial e farmacológico diferente que os preparava para a coleta do sêmen. Os procedimentos de eletroejaculação foram realizados no grupo 1 (n=10), antes do grupo 2 (n=10), a fim de evitar possível interferência por resíduos do feromônio sintético no ambiente.

1) *Tratamento 1* (Grupo 1): Dez cães foram submetidos, individualmente, à presença de uma cadela castrada, por 10 minutos, e, posteriormente, contidos quimicamente pela associação de Cloridrato de Cetamina (Cetamin[®], Syntec, Brasil), $8\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ IM; e Cloridrato de Xilazina (Xilazin[®], Syntec, Brasil), $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ IM. Após a indução anestésica e cateterização da veia radial para a fluidoterapia com solução fisiológica 5mL/kg/h, foi iniciada a eletroejaculação, descrita a seguir.

Eletroejaculação: A probe, lubrificada com KY gel[®] (Johnson & Johnson, Brasil), foi posicionada sobre a próstata dos animais, via retal. O protocolo completo consistia de 10 séries com 10 estímulos elétricos a uma corrente de 100mA e frequência de 50Hz, com duração de 3 segundos e com 3 segundos de descanso. As voltagens elétricas aplicadas nas séries de 1-10 foram: 1,5V; 2,4V; 3,0V; 4,0V; 4,2V; 4,9V;

5,9V; 7,3V; 8,8V; e 10,9V. A intensidade do estímulo foi gradativamente aumentada, até que o cão iniciasse a ejaculação; nesse momento, os estímulos elétricos continuaram a ser aplicados na mesma voltagem, até que a ejaculação terminasse. Após terminar a ejaculação, os estímulos cessaram, mesmo que a sequência de 10 séries não fosse completada. Nas séries onde não se obtinha ejaculação até o 8º estímulo, a probe foi retirada e posicionada novamente sobre a próstata, e os dois estímulos finais foram executados.

O posicionamento correto da probe foi comprovado pela contração da musculatura perianal, nas primeiras 3 séries, e pela distensão das patas traseiras, principalmente a partir da 4ª série.

Os procedimentos entre a indução, coleta do sêmen e o retorno da anestesia duraram até 20 min. Se o animal acordasse durante a eletroejaculação, meia dose da associação de cetamina e xilazina era administrada via endovenosa.

2) *Tratamento 2* (Grupo 2): Dez cães receberam uma dose de Dinoprost Trometamina (Lutalyse[®], Pfizer, Brasil), na proporção de 0,1 mg•kg⁻¹ IM, e foram expostos por 10 minutos à mesma cadela utilizada no tratamento 1, com a vagina impregnada com 40 mg do feromônio sexual sintético 4-metil hidroxibenzoato (cód. H5501, Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, Estados Unidos). A aplicação do feromônio foi realizada com um *swab* umedecido em solução fisiológica, inserido no frasco contendo o feromônio em pó. Este *swab* foi então introduzido na vagina da cadela a uma profundidade de até 2 cm. Após este procedimento, realizou-se a contenção química e eletroejaculação, como descrito no tratamento 1.

2.3. Cateterização da bexiga e coleta do sêmen durante a eletroejaculação

Para investigarmos a presença de espermatozoides antes e após a eletroejaculação, a bexiga dos animais foi cateterizada com sonda uretral nº 4 ou 6, de acordo com o tamanho do cão, e o conteúdo, aspirado com auxílio de seringa de 20mL. O conteúdo aspirado foi depositado em tubos de 50mL.

Durante a eletroejaculação, um dos membros da equipe manteve o pênis do animal exposto e em direção ao interior de um tubo de 50mL pré-aquecido a 37°C.

2.4. Monitoramento dos animais

Todos os animais foram monitorados durante a eletroejaculação. As variáveis observadas foram frequências cardíacas e respiratórias, ambas aferidas a cada 5 minutos; e a temperatura retal, aferida antes e após o procedimento.

2.5. Avaliação do ejaculado

A eficiência do protocolo de eletroejaculação levou em consideração, além da ejaculação antrógrada, a presença de espermatozóides na urina. Foi considerada ejaculação antrógrada a expulsão de qualquer conteúdo líquido pela uretra.

O material coletado foi classificado em: 1) Ejaculados com ou sem espermatozóides: líquidos transparentes, 2) Sêmen puro: líquidos brancos e 3) Sêmen contaminado com urina: líquidos amarelados.

Após a coleta e verificação do volume total obtido, independentemente da classificação recebida, a motilidade total (%) e o vigor (qualidade da motilidade, escore de 0-5) espermático foram avaliados por 3 observadores diferentes, após a colocação de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas, sob microscopia de campo claro, nos aumentos de 100 e 400x.

A morfologia espermática foi avaliada em preparações úmidas, após a diluição da amostra em formol-salino 1:10 entre lâmina e lamínula, sob microscopia de contraste de fase em 1000x (Eclipse 80i, Nikon, Japão), utilizando a classificação segundo método proposto por Oettlé [17]; a concentração espermática foi quantificada na câmara de Neubauer, após a diluição da amostra em formol-salina na proporção de 1:10.; o pH foi avaliado por meio de uma fita colorimétrica de escala entre 0-14 (Universalindikator, Merck, Alemanha); e a osmolaridade, utilizando osmômetro (modelo 5004 Micro-osmett™, Precision Systems Inc., Estados Unidos).

2.6. Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel[®] (Microsoft) e avaliados no ambiente R, versão 2.11.1 (2010). Após o teste de distribuição Shapiro-Wilk, os dados que não se tornaram normais mesmo após transformações pelo arco seno da raiz quadrada, foram comparados pelo Wilcoxon rank sum test. Dados paramétricos foram comparados pelo teste t. As tabelas de contingência foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado. Os dados estão apresentados com suas respectivas médias \pm erros padrões das médias. As médias foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Aspectos clínicos e comportamento durante o procedimento

O peso médio e o escore corporal (escala de 1 a 5) dos animais nos dois grupos experimentais foram similares ($p > 0,05$): Controle: $15,7 \pm 1,5$ kg / $3,9 \pm 0,2$ e PGF 2α + feromônio: $12,6 \pm 1,3$ kg / $3,5 \pm 0,3$.

Imediatamente após a aplicação do Dinoprost Trometamina (Lutalyse[®], Pfizer, Brasil), foram observados os seguintes efeitos colaterais: salivação ($n=10$), defecação aquosa ($n=4$). Não foram observados efeitos relacionados à associação entre a prostaglandina sintética e os anestésicos.

A temperatura dos animais antes e após os tratamentos foi de $39,0 \pm 0,1$ e $38,2 \pm 0,2$ no Grupo 1 $38,9 \pm 0,1$; e $38,7 \pm 0,1$ no Grupo 2 ($p > 0,05$).

A frequência cardíaca variou entre $96,0 \pm 6,7$ e $77,6 \pm 4,9$ no Grupo 1; e $89,1 \pm 7,5$ e $81,6 \pm 6,9$ no Grupo 2 ($p > 0,05$).

A frequência respiratória variou entre $23,1 \pm 1,9$ e $14,8 \pm 2,9$ no Grupo 1; e $21,6 \pm 2,1$ e $15,2 \pm 1,4$ no Grupo 2 ($p > 0,05$).

A vocalização só ocorreu ao final do efeito anestésico para todos os cães a partir da 8ª série de estímulos elétricos e, quando essa vocalização ocorreu, metade da dose inicial de anestésico foi aplicada. Assim que o animal retornou ao plano anestésico, os estímulos elétricos voltavam a ser aplicados na voltagem onde haviam cessado até a ejaculação.

Um dos cães do primeiro tratamento não ejaculou durante a sequência de estímulos elétricos até 100mA, e uma nova sequência com 200mA foi iniciada até que ele ejaculasse. O animal ejaculou na 10ª série.

3.2. Eficiência do protocolo de eletroejaculação

Todos os procedimentos realizados (n=20) foram eficientes, ou seja, resultaram em amostra com espermatozoides, mesmo que decorrente de ejaculação retrógrada. Em todas as amostras amarelas, obtidas mediante a ejaculação antrógrada, observamos espermatozoides. Os cães submetidos à eletroejaculação em cada um dos tratamentos responderam de maneira semelhante aos estímulos elétricos (Tabela 2). Houve ejaculação antrógrada em 80% dos animais do grupo 1 e 100% do Grupo 2, e estas não diferiram entre si (Tabela 1).

O volume padrão aspirado foi de 10mL, pois a maioria dos cães urinava e defecava assim que saía da gaiola. O número e a motilidade dos espermatozoides presentes na bexiga antes da eletroejaculação foi sempre inferior aos valores observados após a eletroejaculação. Isso evidencia que os espermatozoides coletados na bexiga foram expulsos durante a eletroejaculação.

A variável que diferiu significativamente entre os tratamentos foi a motilidade (P=0,019), o que demonstra a maior eficiência do Grupo 2, em relação ao Grupo 1 (Tabela 1). Houve uma tendência (P=0,066) na melhora da variável vigor. Outras variáveis não diferiram entre os tratamentos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Características seminais de ejaculados antrógrados de cães submetidos à eletroejaculação previamente estimulados pela associação PGF2 α / feromônio sexual 4-metil hidroxibenzoato (Grupo 2) e controle (Grupo 1) (média \pm erro padrão).

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	Valor de <i>P</i>
Taxa de sucesso (n)	8 (10)	10 (10)	0,456
Volume (mL)	1,9 \pm 0,8	1,5 \pm 0,5	0,744
pH	7,6 \pm 0,3	7,4 \pm 0,2	0,473
Motilidade total (%)	10,1 \pm 4,5	43,0 \pm 8,3	0,019
Vigor (0-5)	0,5 \pm 0,3	1,4 \pm 0,3	0,066
Número total de espermatozóides (x10 ⁶)	68,1 \pm 23,8	103,7 \pm 36,0	1,000
Osmolaridade (mOsmol/L)	442,8 \pm 66,7	656,5 \pm 79,5	0,170
Espermatozóides normais (%)	59,8 \pm 13	42,7 \pm 8,8	0,324

As ejaculações ocorreram a partir da 5^a série de estímulo no Grupo 1 e a partir da 8^a série no Grupo 2, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagem de eletroejaculações antrógradas e características do ejaculado por série, em cães previamente estimulados pela associação da PGF2 α / feromônio sexual metil 4-hidroxibenzoato (n=10) e o controle (n=10)

Variável	Tratamento	Classificação	Séries									
			1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a
Ejaculação (%)	Controle	Ausente	100	100	100	100	90	80	80	70	30	10
		Sêmen	0	0	0	0	10	10	0	10	30	30
		Urina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Sêmen + urina	0	0	0	0	0	0	0	0	20	10
		EA*	0	0	0	0	0	10	20	20	30	50
	PGF2 α + feromônio	Ausente	100	100	100	100	100	100	100	70	30	0
		Sêmen	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10
		Urina	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0
		Sêmen + urina	0	0	0	0	0	0	0	20	0	30
		EA*	0	0	0	0	0	0	0	0	30	60

*EA = ejaculados avaliados e já computados nas séries anteriores

4. Discussão

Os efeitos colaterais causados pela $PGF2\alpha$, descritos previamente [15], como salivação e defecação, ocorreram logo após a aplicação do fármaco e foram de curta duração. Assim, durante os 10 minutos em que os animais foram submetidos à presença da cadela, os efeitos colaterais foram imperceptíveis. Também não foi observada diferença entre os sinais vitais de frequência cardíaca, respiratória ou temperatura retal, quando os dois grupos foram comparados.

A taxa de sucesso da eletroejaculação foi semelhante nos dois tratamentos (Tabela 2). Uma das explicações para o sucesso nas coletas foi a configuração do eletroejaculador com ondas senoidais, responsável por induzir a ejaculação com menor voltagem, quando comparado com outros equipamentos que utilizam outro tipo de onda, por exemplo na forma quadrática [23]. A sequência de estímulos elétricos baseada no trabalho de Newell-Fugate [5], sem o intervalo de descanso entre as séries, como utilizado por Cunha et al. [6], também permitiu que todo o processo fosse contínuo e gradativo, sem que houvesse perda de estímulo entre as séries. Vale destacar que o reposicionamento da probe antes dos dois últimos estímulos de cada série [5] parece ser fundamental para que os eletrodos mantenham um contato íntimo e homogêneo com a mucosa do reto, durante todo o procedimento.

Os cães utilizados neste trabalho começaram a ejacular com estímulo de 4,0V a 100mA, diferente do observado por Ohl et al. [2], quando os cães começaram a ejacular com 8,0V e 93mA. Quanto ao fluxo do sêmen, que classifica a ejaculação em antrógrada ou retrógrada, Ohl et al. [2] observaram ejaculação retrógrada em 34, contra 35 ejaculações antrógradas. No presente experimento, 100% dos cães do $PGF2\alpha$ + feromônio e 80% do Controle apresentaram ejaculação antrógrada, corroborando o já exposto, de que, provavelmente, o tipo de onda e o procedimento de aplicação de séries de estímulos foram responsáveis pelos resultados mais satisfatórios. A voltagem e a corrente máxima utilizadas, 10,9V e 100mA, foram semelhantes às utilizadas por Ohl et al. [2]: 12,0V e 149mA. Ressalta-se que 40% dos cães do grupo controle ejacularam na 10ª série de estímulos, quando a voltagem máxima foi utilizada.

Existem divergências de resultados quanto à melhora na libido, em estudos onde os animais receberam análogos à $PGF2\alpha$ previamente à coleta de sêmen. Estienne e

Harper [8] utilizaram o Dinoprost Trometamina repetidas vezes, para aumentar a eficiência da coleta de sêmen de varrões, mas não encontraram efeitos deste fármaco nas características seminais; no entanto, em pesquisas anteriores, os mesmos autores observaram que o Dinoprost Trometamina foi eficaz em aumentar a libido de varrões que não haviam sido treinados para a coleta de sêmen [18]. Em cães, observou-se que nem análogos à $PGF2\alpha$, nem a ocitocina eram capazes de sozinhos aumentar o número de espermatozoides do ejaculado [19], mas que na presença de uma cadela em cio, o número de espermatozoides foi maior, quando utilizado o Dinoprost Trometamina. As observações da libido dos cães, neste trabalho, demonstraram que não houve maior interesse dos cães pela fêmea impregnada com o feromônio sintético, quando receberam o Dinoprost Trometamina; pelo contrário, houve uma tendência dos cães em adotar comportamento típico de descanso. Com a finalidade de contrastar esta observação com uma condição natural de exposição de um macho a uma fêmea em cio, realizamos um experimento paralelo no qual observamos 04 cães expostos à presença de uma cadela em cio; observamos que o tempo de reação dos animais, incluindo comportamento de salto e tentativa de cobertura, não foi maior do que 5 minutos.

Os resultados de volume da amostra de sêmen coletada, número total de espermatozoides e motilidade, estão próximos aos previamente encontrados na coleta de sêmen por eletroejaculação em Beagles, 1,8mL (volume), $166,8 \times 10^6$ (número total de espermatozoides) e 30,1% (motilidade total) [2]. Estes autores compararam a eletroejaculação com a coleta usando a vagina artificial e concluíram que a eletroejaculação não prejudica a motilidade progressiva dos espermatozoides. A motilidade do sêmen dos cães do Grupo 2 foi superior à encontrada no Grupo 1. Semelhantemente, Yeste et al. [13] observaram o aumento da motilidade progressiva dos espermatozoides de varrões, logo após a adição da $PGF2\alpha$ ao sêmen. Os experimentos que utilizaram a $PGF2\alpha$ para melhorar a coleta do sêmen em cães se relacionaram à aplicação deste fármaco antes da coleta, e os autores não observaram melhora significativa na motilidade [19]. A ação dos eicosanóides sobre a motilidade do sêmen difere entre as espécies-alvo e a estrutura das prostaglandinas. Enquanto as prostaglandinas E_1 e E_2 foram responsáveis pelo aumento da motilidade em espermatozoides humanos, por levar ao influxo de cálcio e, conseqüentemente, à capacitação espermática [11], a PGF não alterou a

motilidade do sêmen de suínos [20], e demonstrou efeitos ambíguos sobre a motilidade do sêmen bovino, dependendo da dose, nos testes *in vitro* [12].

Os autores que utilizaram a PGF2 α ou análogos para melhorar a eficiência da coleta de sêmen em cães afirmam que o local de ação destes eicosanóides é sobre a musculatura lisa do epidídimo e ducto deferente [14,15]. Reyes-Moreno [24] e Sostaric [25] descrevem algumas proteínas presentes no lúmen do epidídimo capazes de se incorporar à membrana espermática através dos epididimossos, e que são capazes de proteger os espermatozóides de processos oxidativos de bovinos e equinos. Mais ainda, Reyes-Moreno [24] declaram que algumas delas mantêm a motilidade do sêmen por um período prolongado, quando adicionadas ao sêmen descongelado. Desta forma, o aumento da motilidade espermática verificada no grupo que recebeu a PGF2 α e o estímulo sexual antes da eletroejaculação (Tabela 1) poderia ser explicado por uma elevação da quantidade de proteínas presentes no epidídimo, expulsas durante o procedimento de eletroejaculação naquele grupo.

O número total de espermatozóides não diferiu entre os tratamentos. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que não observaram efeitos positivos da PGF2 α sozinha sobre a concentração espermática em cães [19]. No entanto, em trabalho posterior, foi observado que a associação da aplicação da PGF2 α com a presença de uma cadela em cio aumentou o número total de espermatozóides no ejaculado [15] e, como a produção espermática está ligada ao peso dos animais [21], Kustriz & Hess [15] discutem que a diferença no número de espermatozóides poderia ter sido causada pela grande diferença de peso entre os cães dos diferentes grupos.

A decisão de avaliar a osmolaridade do ejaculado foi tomada pensando nesta variável como mais uma indicadora da contaminação por urina e que poderia reduzir a motilidade espermática. Entretanto, não houve diferença significativa entre os valores de osmolaridade nos dois grupos.

A cor amarela do ejaculado indica que houve a contaminação por urina, em 50% dos cães do Grupo 1 e em 80% dos cães do Grupo 2. Mesmo assim, verificamos que a maior porcentagem de ejaculados contaminados por urina, no segundo tratamento, não foi suficiente para interferir na motilidade espermática. Pelos resultados de contaminação do ejaculado por urina, pode-se observar que a associação da

xilazina, agonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos e quetamina, não foi eficaz em prevenir a micção durante a ejaculação; diferentemente da afirmação de Romagnoli [22], sobre o uso de agonistas α -2 adrenérgicos para fechar o colo da bexiga e evitar a micção durante a ejaculação.

Não houve interferência do Dinoprost Trometamina no período de latência (período entre os início dos estímulos elétricos e a ejaculação), diferentemente do observado quando se utilizou antagonistas α_2 -adrenérgicos para se investigar a ação destes fármacos sobre a ejaculação em cães [10].

Conclui-se que o aumento da motilidade e do número total de espermatozoides obtidos em ejaculações antrógradas com o estímulo prévio da PGF2 α e com a exposição ao feromônio antes da eletroejaculação indica que a associação destes eicosanóides com os anestésicos é segura para a utilização em cães; a associação entre o Dinoprost Trometamina e o feromônio sexual 4-metil hidroxibenzoato demonstrou ser eficiente para melhorar a motilidade espermática para os cães utilizados neste trabalho, e as outras variáveis avaliadas indicam que é possível conseguir melhores resultados na eletroejaculação, quando os cães recebem estímulos ejaculatórios previamente à eletroejaculação; o procedimento de eletroejaculação adotado, independentemente da exposição dos animais a estímulos pré-ejaculatórios, resultou, em média, 80% de ejaculações antrógradas e 100% de eficiência total, considerando as ejaculações retrógradas.

Agradecimentos

À Médica Veterinária Mônica Luz e à aluna Priscilla Carla Santos Costa, pelo auxílio nas cirurgias de castração. Ao CNPq, pelo suporte financeiro, e à FAPERJ pela concessão das bolsas de estudo.

Referências bibliográficas

[1] Kutzler MA. Semen collection in the dog. Theriogenology 2005;64:747-54.

- [2] Ohi DA, Denil J, Cummins C, Menge AC, Seager SWJ. Electroejaculation does not impair sperm motility in the beagle dog: a comparative study of electroejaculation and collection by artificial vaginal. *J Urol* 1994;152:1034-37.
- [3] Goodrowe KL, Hay MA, Platz, CC, Behrns SK, Jones MH, Waddell WT. Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2008;53:299-08.
- [4] Minter LJ, DeLiberto TJ. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. *Theriogenology* 2005;64:1898–12.
- [5] Newell-Fugate, AE. The effects of two formulations of deslorelin on the reproduction of male African wild dogs (*Lycaon pictus*). Master's Dissertation, University of Pretoria, South Africa, 2009.
- [6] Cunha ICN, Morato RG, Santos IP. Biometry of the reproductive system and the ejaculation response of maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) to electroejaculation procedure. *In: 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Viena, 2008:68-69.*
- [7] Johnston SD, Ward D, Lemon J, Gunn I, MacCallumb CA, Keeley T, Blyde D. Studies of male reproduction in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Anim Reprod Sci* 2007;100:338–55.
- [8] Estienne MJ, Harper AF. Semen characteristics and libido in boars treated repeatedly with PGF₂{alpha.}. *J Anim Sci* 2004; 82:1494-98.
- [9] Masoumi R, Towhidi A, Javaremi AN, Nabizadeh H, Zhandi M. Cloprostenol injection improves reproductive characteristics in low libido Iranian Holstein bulls. *Pak J Biol Sci* 2008; 11(7):1027-31.

- [10] Yonezawa A, Ando R, Watanabe C, Furuta S, Kutsuwa M, Sakurada S, Kimura Y. α_2 -Adrenoceptor antagonists: effects on ejaculation, penile erection and pelvic thrusting behavior in dogs. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;70:141-47.
- [11] Shimizu Y, Yorimitsu A, Maruyama Y, Kubota T, Aso T, Bronson RA. Prostaglandins induce calcium influx in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1998;4(6):555-61.
- [12] Karahan I, Türk G, Gür S. In vitro effects of prostaglandin F2 α and metamizol on the motility of diluted bull semen. *Turk J Vet Anim Sci* 2006;30:271-78.
- [13] Yeste M, Briz M, Pinart E, Sancho S, Garcia-Gil N, Badia E, Bassols J, Pruneda A, Bussalleu E, Casas I, Bonet S. Boar spermatozoa and prostaglandin F2 α Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F2 α to the short-term extender over cooling time. *Anim Reprod Sci* 2008;108:180–95.
- [14] Hess M. Documental and anecdotal effects of certain pharmaceutical agents used to enhance semen quality in the dog. *Theriogenology* 2006;66:613-17.
- [15] Kustritz MVR, Hess M. Effect of administration of prostaglandin F2alpha or presence of an estrous teaser bitch on characteristics of the canine ejaculate. *Theriogenology* 2007;67:255–58.
- [16] Goodwin, M.; Gooding, K.M.; Regnier, F. Sex pheromone in the dog. *Science* 1979;203:559-61.
- [17] Oetllé EE. Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 47:257-60.
- [18] Kozink DM, Estienne MJ, Harper AF, Knight JW. The effect of lutalyse on the training of sexually inexperienced boars for semen collection. *Theriogenology* 2002; 58(5):1039-45.

- [19] Traas AM, Kustritz MVR. Effect of administrating oxytocin or prostaglandin $F_{2\alpha}$ on characteristics of the canine ejaculate. *Can Vet J* 2004;45:999–02.
- [20] Maes DGD, Mateusen B, Rijsselaere T, De Vlieghe S, Van Soom A, de Kruif A. Motility characteristics of boar spermatozoa after addition of prostaglandin $F_{2\alpha}$. *Theriogenology* 2003;60:1435–43.
- [21] Olar TT, Amann RP, Pickett BW. Relationships Among Testicular Size, Daily Production and Output of Spermatozoa, and Extragonadal Spermatozoal Reserves of the Dog. *Bio Reprod* 1983;29:1114-20.
- [22] Romagnoli S. Infertility in the male dog - A diagnostic approach. Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, SPCV, Oeiras, Portugal. 2002:171-76.
- [23] Furmam JW, Ball L, Seidel GE. Electroejaculation of bulls using pulse waves of variables frequency. *J. Anim. Sci.* 1975; 40:665-70.
- [24] Reynes-Moreno C, Boilard M, Sullivan R, Sirard M. Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. *Mol Reprod Develop* 2002;63:500-09.
- [25] Sostaric E, Aalberts M, Gadella BM, Stout TAE. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 2008; 107:237-48.

3.2. ARTIGO II

(Formato ABNT)

A combinação da cetamina com a xilazina é capaz de evitar a dor durante a eletroejaculação em cães.

Israel Pereira dos Santos, Rodrigo Fortunato de Oliveira, Cristina Leite Francisco Gualberto Ramos, José Leonardo Gualberto Ramos, Isabel Candia Nunes da Cunha.

Resumo

Este trabalho verificou se a combinação entre cetamina e xilazina é eficaz para evitar a dor de cães submetidos à eletroejaculação (EEJ). Para tanto, dez cães sem raça definida foram anestesiados com a combinação do Cloridrato de Cetamina (Cetamin®, Syntec, Brasil), $8\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ IM, e Cloridrato de Xilazina (Xilazin®, Syntec, Brasil), $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ IM. Após os animais entrarem em plano anestésico, foi iniciado o procedimento de EEJ. Para verificar a presença de estímulos dolorosos, foram observadas médias das variáveis: frequências cardíaca/respiratória, aferidas a cada 5 minutos, e temperatura corporal, aferida antes e após a EEJ. As médias das variáveis frequências cardíaca, respiratória e temperatura foram sempre inferiores aos valores iniciais (96 ± 7 batimentos cardíacos por minuto, 24 ± 2 movimentos respiratórios por minuto e $39,0\pm 0,1^\circ\text{C}$), e sugere que o protocolo anestésico utilizado para a EEJ é seguro para obter sêmen de cães e evita que os animais sofram dor.

Palavras-chaves: eletroejaculação, dor, cão.

Introdução

A dor é a experiência sensorial ou emocional desagradável associada com a destruição tecidual atual ou potencial¹. Os estímulos elétricos utilizados para a coleta de sêmen por eletroejaculação causam grande desconforto ou dor no homem (BRINDLEY, 1981); conseqüentemente, entende-se que esta técnica possa ser dolorosa aos animais. O cortisol, utilizado em trabalhos que qualificam o bem-estar

¹ IASP. International association for the study of pain. www.iasp-pain.org

animal, não é um bom indicativo da presença de dor, pois animais que são levados ao mesmo local onde receberam vacina, em ocasiões passadas, estarão em estresse, mesmo que não seja realizada qualquer técnica invasiva (MOSURE et al., 1998). A mesma abordagem pode ser feita com relação à frequência cardíaca, em animais conscientes.

Uma resposta endócrina viável para identificar a presença de dor em touros submetidos à eletroejaculação foi a quantificação da progesterona com origem na adrenal (FALK et al., 2001).

Em cães, as variáveis mais utilizadas para indicar a presença de dor são: as frequências cardíaca / respiratória e a temperatura corporal; ambas aferidas antes, durante e após a aplicação de estímulos potencialmente dolorosos (STASIAK et al., 2003; HESBACH, 2007).

A cetamina é um anestésico dissociativo frequentemente associado a um α 2-adrenérgico, como a xilazina ou a romifidina. O tempo em que os reflexos de dor foram avaliados em dois estudos distintos, tanto pelo uso de estímulos dolorosos na região abdominal próxima ao umbigo, esfíncter anal e espaço interdigital, quanto durante a castração eletiva, variou entre 30-45 minutos (LUNA et al., 2000) e alcançou até 60 minutos de duração, quando os cães anestesiados com quetamina e xilazina não sofreram estímulos dolorosos e foram monitorados pelas funções cardiorrespiratórias (HASKINS et al., 1986).

Existe uma variedade de anestésicos que pode ser utilizada na contenção química para a eletroejaculação em cães; dentre estes, a associação entre a tiletamina e zolazepam (GOODROWE et al., 1998; CUNHA et al., 2008), o halotano (OHL et al., 1994), associação entre a quetamina e a xilazina (MINTER e De LIBERTO, 2005), e também a associação entre quetamina, medetomidina e atropina (JOHNSTON et al., 2007). A combinação da quetamina com a xilazina, em função da ação α -2 adrenérgica deste último fármaco, induz o fechamento do colo da bexiga; desta forma, evita a contaminação do sêmen coletado durante a eletroejaculação por urina (ROMAGNOLI, 2002); no entanto, esta ação não foi observada por Dooley et al. (1990).

Em touros, a xilazina via epidural foi eficiente em eliminar a dor durante a eletroejaculação, embora a xilazina via intravenosa não tenha sido tão eficiente. Entretanto, o uso deste medicamento naquela espécie, via epidural, reduziu a frequência cardíaca (MOSURE et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi acompanhar variáveis indicadoras de dor durante o procedimento de eletroejaculação com ondas sinoidais, em cães anestesiados pela combinação de quetamina com xilazina.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 10 cães sem raça definida, sem alteração clínica aparente, com peso entre 7,6-22,2kg (Média=15,7 ± 1.5) e considerados aptos à coleta de sêmen por eletroejaculação. Os cães foram levados semanalmente ao Hospital Veterinário, e cada um deles passou por uma avaliação clínica e ultrassonográfica antes da realização do procedimento. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais /UENF (protocolo número 67/2009) e realizado no verão 2009/2010, no período de novembro a março.

A adaptação dos animais foi realizada em três dias, nos quais estes foram alojados em gaiolas individuais. Nos dois primeiros dias, os animais receberam ração (BillDog Premium[®], Extrutecnica, Brasil), duas vezes ao dia, e água à vontade. No terceiro dia, foi implantado um regime de jejum pré-anestésico de 12h, e os cães foram submetidos ao protocolo de eletroejaculação.

Procedimento

As coletas foram realizadas no ambulatório da clínica reprodutiva de pequenos animais do HV-UENF, com temperatura ambiente controlada de ± 23°C. O eletroejaculador (Santa Lydia Laboratórios – Brasil) foi fabricado sob as seguintes especificações: voltagem 0-10,9V, corrente de 100 e 200 mA, ondas sinoidais com frequência de 50 e 60 Hz, probe com dois eletrodos longitudinais paralelos de 8 cm de comprimento; comprimento total da probe de 25,4cm e diâmetro de 1,6cm, similar ao previamente descrito (OHL et al., 1994 e NEWELL-FUGATE, 2009).

Antes de iniciar o procedimento de eletroejaculação, os cães foram contidos quimicamente pela combinação do Cloridrato de Cetamina (Cetamin[®], Syntec, Brasil), 8mg kg⁻¹ IM; e Cloridrato de Xilazina (Xilazin[®], Syntec, Brasil), 1mg kg⁻¹ IM. Após a indução anestésica, foi feita a cateterização da veia radial, para a fluidoterapia com solução fisiológica 5mL/kg/h. Foi considerado que os animais estavam em plano anestésico quando os mesmos perderam o reflexo postural e se

mantinham em decúbito dorsal. Já em plano anestésico, a eletroejaculação foi realizada como descrito a seguir.

Eletroejaculação: A probe, lubrificada com KY gel[®] (Johnson & Johnson, Brasil), foi posicionada sobre a próstata dos animais, via retal. O protocolo completo consistia de 10 séries com 10 estímulos elétricos a uma corrente de 100mA e frequência de 50Hz, com duração de 3 segundos, e com 3 segundos de descanso. As voltagens elétricas aplicadas nas séries de 1-10 foram: 1,5V; 2,4V; 3,0V; 4,0V; 4,2V; 4,9V; 5,9V; 7,3V; 8,8V; e 10,9V. A intensidade do estímulo foi gradativamente aumentada, até que o cão iniciasse a ejaculação; nesse momento, os estímulos elétricos continuaram a ser aplicados na mesma voltagem, até que a ejaculação terminasse. Após terminar a ejaculação, os estímulos cessaram, mesmo que a sequência de 10 séries não tivesse sido completada. Nas séries onde não se obtinha ejaculação até o 8º estímulo, a probe foi retirada e posicionada novamente sobre a próstata, e os dois estímulos finais foram executados.

Monitoração dos animais

As variáveis avaliadas mediante a auscultação com estetoscópio foram frequências cardíacas e respiratórias, ambas aferidas a cada 5 minutos; e temperatura retal, aferida antes e após o procedimento.

A duração aproximada da contenção química, na dosagem utilizada, foi de 20 minutos. Quando algum animal demonstrou movimentos voluntários da cabeça ou qualquer vocalização, a eletroejaculação foi interrompida, e metade da dose inicial de anestésico foi aplicada via intravenosa, e, somente após o retorno ao plano anestésico, os estímulos elétricos continuaram a ser aplicados até a ejaculação.

Avaliação do sêmen

Após a coleta e verificação do volume total obtido, foram realizadas as avaliações microscópicas de motilidade total (%) e vigor (qualidade da motilidade, classificada entre 0-5, onde o score 0 é dado às amostras sem movimento progressivo, mesmo que haja movimento da cauda, e 5 é o movimento espermático com motilidade progressiva), de modo subjetivo, em alíquotas de 10µL dos ejaculados, entre lâmina e lamínula 22x22mm sobre microscopia de campo claro, nos aumentos de 100 e 400x; e foi avaliada a concentração espermática com auxílio da câmara de Neubauer, após a diluição da amostra em formol-salina na proporção de 1:10. A

morfologia espermática foi avaliada em preparações úmidas, sob microscopia de contraste de fase, no aumento de 1000x, quando 200 espermatozoides por amostra foram classificados segundo (OETTLÉ, 1993).

Análise estatística

Os dados foram tabulados no software Microsoft Excel 2003 (Microsoft) e analisados no ambiente R versão 2.11.1 (2010). A normalidade dos dados foi analisada pelo *Shapiro-Wilk normality test* a 5%. Como os dados da frequência respiratória não apresentaram distribuição normal, mesmo após transformações, as médias aferidas nos diferentes tempos foram comparadas ao tempo zero pelo teste não-paramétrico pareado *Wilcoxon signed rank test* a 5%. Com relação à temperatura, os dados se apresentaram dentro da normalidade e foram submetidos à ANOVA e ao teste t pareado. Todos os dados em cada tempo estão demonstrados com suas médias e erros padrões.

Resultados

Encontram-se na tabela 1 as médias para as frequências cardíacas e respiratórias durante a eletroejaculação.

Tabela 1 – Média \pm erro padrão dos sinais vitais antes e durante o processo de eletroejaculação em cães (n=10).

Variáveis	Tempo (minutos)				
	0	5	10	15	20
Frequência cardíaca	96 \pm 7	89 \pm 6	78 \pm 6 [†]	86 \pm 11	76 \pm 6
Frequência respiratória	24 \pm 2	18 \pm 2 [†]	13 \pm 1 [†]	13 \pm 1 [†]	15 \pm 3 [†]

[†] as médias diferem do tempo zero na mesma linha pelo *Wilcoxon signed rank test* a 5%.

A temperatura retal inicial, 39,0 \pm 0,1 $^{\circ}$ C, e temperatura retal final, 38,7 \pm 0,2 $^{\circ}$ C ($P=0,09$).

A taxa de sucesso observada com o protocolo de eletroejaculação utilizado foi de 100%, dos quais 80% das ejaculações foram do tipo antrógrada, e 20% foram apenas do tipo retrógrada, quando o sêmen flui em direção à bexiga.

A motilidade total, volume e número totais de espermatozoides recuperados foram, respectivamente: 10,0 \pm 4,5% (0-40%); 1,9 \pm 0,8mL (0,07-5 mL) e 68,1 \pm 23,8 (7,5-150) milhões de espermatozoides.

Discussão

Não foi observado aumento nas frequências cardíacas e respiratórias durante a eletroejaculação, o que demonstra que os animais não sofreram dor em consequência dos estímulos elétricos, sob o efeito da anestesia. Hesbach (2007) e Stasiak et al. (2003) indicam que o aumento destas variáveis é o parâmetro utilizado para entender que o cão está passando por estresse ou dor.

Sabe-se que os protocolos anestésicos em geral causam depressão do sistema cardiorrespiratório (HASKINS et al., 1986), e é por isso que, a partir do tempo de 5 minutos ($p<0,05$), a frequência respiratória ficou abaixo daquela aferida no tempo inicial. Os resultados de Haskins et al. (1986) e Luna et al. (2000) corroboram os encontrados no presente trabalho, pois os autores observaram a redução da frequência respiratória, assim que os animais entraram em plano anestésico, e a

redução da frequência cardíaca aos 15 minutos, quando utilizaram a combinação de cetamina com xilazina, precedidos ou não pela medicação pré-anestésica levopromazina. Ainda com relação à função cardiorrespiratória, Luna et al. (2000) declararam que a quetamina combinada com a xilazina foi segura para a manutenção dos cães, segundo este aspecto. Aqueles autores observaram apenas mioclonias, tremores e espasmos musculares, também observados no presente trabalho, durante a anestesia. A arritmia sinusal, indicativo precoce da parada cardíaca (HASKINS et al., 1986), observada por Luna et al. (2000), é um importante aspecto a se considerar, porém esta não foi avaliada no presente trabalho.

Uma metodologia para classificar a dor em escalas foi criada na Universidade de Glasgow, Reino Unido, e leva em consideração o comportamento do animal após estímulos dolorosos, como, por exemplo, as cirurgias (MORTON et al., 2005). A técnica da Universidade de Glasgow, modificada por Murrel et al. (2008), leva em consideração basicamente os seguintes comportamentos: conduta do animal (agressiva, desinteressada, nervoso/ansioso, quieto/indiferente, satisfeito), postura (rígida, em alerta, normal), conforto (desconfortável, confortável), vocalização (choro, gemido, grito e quieto), atenção à ferida cirúrgica (mordendo, olhando e ignorando), mobilidade (recusando-se a andar, andar enrijecido, lento/relutante, mancando e normal), resposta ao toque (chorando, hesitando, mordendo, rosnando e sem resposta). As técnicas acima citadas não são aplicáveis quando os animais se encontram em plano anestésico.

A abordagem da definição de dor foi importante para explicar as variáveis que foram escolhidas para identificar a presença de estímulos dolorosos, pois variáveis como a vocalização ou mesmo o aumento do cortisol podem demonstrar a reação do animal a um desconforto ou memória de práticas dolorosas associadas ao local onde a eletroejaculação será executada (MOSURE et al., 1998).

É importante ressaltar que, no presente estudo, foi utilizada a eletroejaculação com ondas do tipo sinoidais, que aumentam a eficiência da coleta, visto que levam à ejaculação com voltagens menores em relação às ondas quadráticas (FURMAM et al. 1975; PALMER, 2005). Assim, é possível fazer com que o cão atinja a ejaculação em um curto período de tempo, antes do final do efeito anestésico, quando haveria estresse e necessidade da aplicação de uma outra dose de anestésico para que o procedimento de eletroejaculação prosseguisse.

Conclui-se que a combinação entre a quetamina e a xilazina é eficaz no controle da dor em cães submetidos à coleta de sêmen por eletroejaculação.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Médica Veterinária Mônica Jorge Luz e à aluna de Medicina Veterinária Priscilla Carla Santos Costa, pela colaboração durante o experimento. Agradecem ainda à FAPERJ, pela concessão das bolsas de estudo, e ao CNPq, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Referências bibliográficas

BRINDLEY, G.S. Electroejaculation: its technique, neurological implications and uses. **Journal of Neurology, neurosurgery, psychiatry**, v. 44, n. 1, p. 9-18, 1981.

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

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

FALK, A.; WALDNER, C. L.; COTTER, B.; GUDMUNDSON, J.; BARTH, A. D. Effects of epidural lidocaine anesthesia on bulls during eletroejaculation of bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 116-120, 2001.

FURMAM, J.W.; BALL, L.; SEIDEL, G.E. Electroejaculation of bulls using pulse waves of variables frequency. **Journal of Animal Science**, v. 40, n. 4, p.665-670, abr. 1975.

GOODROWE, K.L.; HAY, M.A.; PLATZ, C.C.; BEHRNS, S.K.; JONES, M.H.; WADDELL, W.T. Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1, p.299-308, 1998.

HASKINS, S.C.; PATZ, J.D.; FARVER, T.B. Xylazine and xylazine-ketamine in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 3, 1986.

HESBACH, A.L. Techniques for objective outcome assessment. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, n. 4, p.146-154, 2007.

JOHNSTON, S.D.; WARD, D.; LEMON, J.; GUNN, I.; MACCALLUMB, C.A.; KEELEY T.; BLYDE, D. Studies of male reproduction in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 3, p. 338–55, 2007.

LUNA, S.P.L.; NOGUEIRA, C.S.; CRUZ, M.L.; MASSONE, F.; CASTRO, G.B. Romifidine or xylazine combined with ketamine in dogs premedicated with methotrimeprazine. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 37, n. 2, 2000. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000200001&lng=en&nrm=iso>. access on 31 July 2011. doi: 10.1590/S1413-95962000000200001.

MINTER, L.J.; DeLIBERTO, T.J. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p.1898–1912, 2005.

MORTON, C.M.; REID, J.; SCOTT, M.; HOLTON, L.L.; NOLAN, A.M. Application of a scaling model to establish and validate an interval level pain scale for assessment of acute pain in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 12, p. 2154-2166, 2005.

MOSURE, W.L.; MEYERS, R.A.; GUDMUNDSON, J.; BARTH, A.D. Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in bull. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 39, n. 8, p. 504-506, 1998.

MURREL, J.C.; PSATHA, P.; SCOTT EM, REID J, HELLEBREKERS LJ. Application of a modified form of the Glasgow pain scale in a veterinary teaching centre in the Netherlands. **Veterinary Record**, v. 162, n. 13, p. 403-408, 2008.

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

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

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

PALMER, C.W. Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 469-479, 2005.

ROMAGNOLI S. Infertility in the male dog - A diagnostic approach. **Proceedings of the Veterinary Sciences Congress**, SPCV, Oeiras, Portugal. 2002:171-76.

STASIAK, K.L.; MAUL, D.; FRENCH, E.; HELLYER, P.W.; VANDEWOUDE, S. Species-Specific Assessment of Pain in Laboratory Animals. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science / American Association for Laboratory Animal Science**, v. 42, n. 4, p. 13-20, 2003.

3.3 ARTIGO III

(Formato ABNT)

Resfriamento do sêmen canino previamente contaminado por urina

Israel Pereira dos Santos, Carolina Montes Silva, Fausto Paes de Carvalho, Isabel Candia Nunes da Cunha

Resumo

A contaminação por urina é um problema encontrado durante a coleta de sêmen do cão. Os casos possíveis de contaminação são a micção concomitante à ejaculação e, também, a ejaculação retrógrada. Os relatos deste problema são comuns em trabalhos de congelamento de sêmen de canídeos, obtido pela técnica de eletroejaculação; e os efeitos da urina sobre a preservação dos espermatozoides é desconsiderado. No presente trabalho, verificou-se a porcentagem máxima de contaminação com urina compatível com o resfriamento do sêmen canino por 24h. Para tanto, foram utilizados 10 ejaculados de diversos cães, incubados em diferentes concentrações de urina diluída em ringer simples, a 37°C, por 20 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas, e o decantado, contendo os espermatozoides, foi ressuspenso em um diluidor à base de leite, para o resfriamento a 5°C, por 24h. Os resultados do sêmen incubado em diferentes concentrações de urina + ringer simples demonstraram que concentrações $\geq 13\%$ de urina diferiram do sêmen diluído apenas em ringer simples. Entretanto, após o resfriamento, somente os espermatozoides que foram incubados em soluções $>25\%$ de urina diferiram daqueles incubados apenas em ringer simples. Conclui-se que o sêmen canino suporta concentrações de urina $<13\%$ por pelo menos 20 minutos, e que o diluidor à base de leite é eficiente para recuperar a motilidade do sêmen que foi contaminado com uma concentração de urina $\leq 25\%$, por até 24h, sob temperatura de 5°C.

Introdução

O sêmen canino pode ser contaminado por urina em algumas situações, como por exemplo, na ejaculação em direção à bexiga, chamada de ejaculação retrógrada (DOOLEY et al., 1990; OHL et al., 1994; BEAUFAYS et al., 2008).

A contaminação do sêmen pela urina foi estudada no homem e no equino (CRICH e JEQUIER, 1978; MAKLER et al., 1981; KIM e KIM, 1998; GRIGGERS et al., 2001). No homem, as causas da contaminação do sêmen com urina podem ser: doenças crônicas como a diabetes, disfunção após a ressecção prostática e hipertensão idiopática do esfíncter uretral externo (BRASSESCO et al., 1988). Nos cães, o hipotireoidismo (ROOT et al., 1994) foi relatado como uma doença metabólica causadora da ejaculação retrógrada. A coleta de sêmen por estímulo manual do pênis (DOOLEY et al., 1990; BEAUFAYS et al., 2008) ou a eletroejaculação (OHL et al., 1994, CUNHA et al., 2008) também podem induzir o fluxo do sêmen em direção à bexiga, em canídeos.

Quando os espermatozóides são submetidos a um ambiente contaminado por urina, a primeira alteração a ser percebida é a redução na motilidade (MAKLER et al., 1981; GRIGGERS et al., 2001). Os fatores da urina considerados mais prejudiciais aos espermatozóides são as diferenças de osmolaridade e pH entre o plasma seminal e a urina (MAKLER et al., 1981; GRIGGERS et al., 2001).

KIM e KIM (1998) avaliaram o efeito da ação dos componentes nitrogenados – amônia, creatinina, uréia e ácido cítrico - da urina sobre os espermatozóides humanos. Os resultados encontrados indicam que a amônia foi o agente nitrogenado mais tóxico aos espermatozóides humanos, mas os efeitos deste composto só foram evidenciados após 30 minutos de incubação do sêmen em soluções de NaCl (0,9%) + amônia. Na urina do cão, o principal componente nitrogenado encontrado é a uréia, uma vez que a maioria das proteínas não atravessa o aparelho de filtração glomerular. A uréia, formada no fígado, é não-tóxica, produto da metabolização da amônia (REECE, 1996). A concentração da uréia na urina do cão pode variar de 7-16 mg por 100mL (KOLB, 1987).

As técnicas para contornar os efeitos deletérios da urina sobre o espermatozóide podem ser pré ou pós-ejaculatórias. Entre as pré-ejaculatórias, incluem-se o tamponamento da urina do paciente por meio da ingestão de soluções com NaHCO_3 (BRASSESCO et al., 1988); o equilíbrio da osmolaridade pela hidratação oral do

paciente (KIM e KIM, 1998), ou a terapia com fármacos alfa-adrenérgicos que impedem a retroejaculação, como a fenilpropanolamina (BEAUFAYS et al., 2008). Em se tratando de técnicas pós-ejaculatórias, usa-se a centrifugação do sêmen contaminado por urina (GRIGGERS et al., 2001; NICOLAS et al., 2011), diluidores que reduzem as perdas da viabilidade espermática, como o meio Cheng, em humanos, que contém NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃ e glicose (TSAI et al., 1990), ou pelo uso de diluidor à base de leite, em equinos (GRIGGERS et al., 2001).

Tentativas de correção do pH e da osmolaridade da urina já foram realizadas, pois estes são os dois fatores mais associados aos efeitos deletérios da urina (MAKLER et al., 1981; GRIGGERS et al., 2001).

Uma vez que a correção do pH ou da osmolaridade da urina do animal nem sempre é possível, a cateterização da bexiga antes da coleta de sêmen por eletroejaculação é recomendada, pois permite que grande quantidade da urina seja retirada. Cunha et al. (2008) injetaram diluidores à base de leite na bexiga de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) e, a despeito da qualidade do sêmen coletado (motilidade total = $30 \pm 20\%$; e vigor = $1,33 \pm 0,58$), não foi relatado qualquer problema de saúde naqueles animais, após as coletas de sêmen.

Em trabalhos que descrevem o processo de eletroejaculação para criopreservação do sêmen de canídeos (OHL et al., 1994; GOODROWE et al., 1998) e ursídeos (NICOLAS et al., 2011), são recorrentes os relatos da contaminação do sêmen por urina; no entanto, a tecnologia de sêmen utilizada no congelamento destas células não leva em consideração este evento muito importante entre a coleta e a fertilização.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do resfriamento sobre o sêmen submetido previamente a diferentes concentrações de urina diluída em ringer simples.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 10 animais de diferentes raças (1 Blue Heller, 3 Labradores, 1 Poodle, 1 Pastor Canadense, 1 Terrier Brasileiro, 3 Border Collies), com idade entre

1,5-7,0 anos (6 ± 1), e pesando entre 7,0-32,0 kg (23 ± 3). Todos os animais foram provenientes de criadores particulares.

Coleta do sêmen e da urina

As coletas de sêmen aconteceram 2 vezes em uma semana, e somente a segunda coleta de cada cão foi utilizada nos experimentos. Foi utilizada a segunda fração de 10 ejaculados, coletados pela massagem peniana, com auxílio de luvas, funis e tubos plásticos de 15mL com tampas rosqueadas. Todas as amostras de sêmen foram levadas ao laboratório, onde o ensaio começou imediatamente, em um intervalo inferior a 30 minutos.

A urina autóloga foi coletada imediatamente após o sêmen, mediante a micção espontânea do cão, em funis e tubos plásticos já descritos na coleta do sêmen.

Procedimento experimental

A urina foi diluída nas proporções de 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2 (concentrações aproximadas de 3, 6, 13, 25 e 50%, respectivamente) em ringer simples.

Alíquotas de 100 μ L de sêmen foram diluídas em 400 μ L de urina e nas soluções de ringer + urina descritas acima.

Realizadas as diluições do sêmen em urina ou ringer simples + urina, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C, por 20 minutos (visto que este período mimetizava o tempo necessário para realizar a eletroejaculação em cães, sendo, desta forma, o período no qual uma amostra de sêmen estaria em contato com a urina em condições reais de uma coleta de sêmen por eletroejaculação). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 700 x g por 7 minutos (LOPES et al., 2009). Para o resfriamento, o sobrenadante foi retirado, e 400 μ L do diluidor Kenney foi adicionado ao decantado. Todas as amostras diluídas em Kenney foram resfriadas em um refrigerador Minitub[®] (Minitub, Alemanha) a 5°C, por 24h.

Avaliações do sêmen fresco e diluído nas soluções de ringer com urina

As avaliações macroscópicas realizadas foram sobre cor, aspecto e volume.

As propriedades físico-químicas avaliadas do sêmen foram o pH, com a fita colorimétrica 0-14 Universalindikator (Merck, Alemanha), e a osmolaridade, com o osmômetro (modelo 5004 Micro-osmett™, Precision Systems Inc., Estados Unidos).

A concentração foi aferida após a diluição do sêmen em formol-salina na proporção de 1:100. Os espermatozóides foram contados na câmara de Neubauer, sob microscopia de contraste de fase (modelo Eclipse 80i, Nikon, Japão). A morfologia foi avaliada em alíquotas de sêmen de 10 µL fixadas em formol salina, na proporção de 1:10, sob microscopia de contraste de fase, com magnificação de 1000x (microscópio modelo Eclipse 80i, Nikon, Japão), segundo a classificação proposta por Oettlé et al. (1993).

A motilidade total e progressiva do sêmen foi avaliada no sistema computadorizado CEROS 10.8®, Hamilton Thorne-Research, Estados Unidos, segundo o *setup* proposto por Iguer-Ouada e Verstegen (2001), nos tempos de 0, 20 minutos e de 24 horas. Para tanto, uma alíquota de 7µL da amostra foi colocada entre lâmina 25,4x 76,2mm e lamínula 22x22mm pré-aquecidas a 37°C.

Para verificar a integridade e funcionalidade da membrana espermática, foi utilizado o teste hiposmótico (HOST), em que alíquotas de 10µL de sêmen provenientes de cada diluição entre sêmen e urina; após 24h de resfriamento, foram incubadas por 45 minutos em uma solução hiposmótica de frutose 60mOsmol/l. Ao final da incubação, a morfologia de 200 espermatozóides foi avaliada entre lâmina e lamínula, no aumento de 1000x, por microscopia de contraste de fase (microscópio modelo Eclipse 80i, Nikon, Japão). As células que enrolaram a cauda após a incubação foram consideradas íntegras e funcionais (KUMI-DIAKA, 1993); as caudas que já estavam enroladas antes de teste, identificadas na análise morfológica, foram desconsideradas.

As amostras de urina foram avaliadas com as tiras de urinálise Uriquest (Labtest diagnóstica S/A), que permitem fazer a determinação semiquantitativa de bilirrubina, cetonas, densidade, glicose, leucócitos, nitrito, pH, proteínas, sangue e urobilinogênio. A osmolaridade também foi avaliada, do mesmo modo que as amostras de sêmen.

Análise estatística

Os dados foram tabulados no *software* Microsoft Excel, e foram calculadas as médias e erros padrões. Neste mesmo software, as variáveis demonstradas em porcentagem foram transformadas pelo arco seno da raiz quadrada de X, com a fórmula:

$$=ASEN((RAIZ('nome da célula com o valor a ser transformado'/100)))$$

Após as transformações necessárias, os tratamentos foram comparados pela análise de variância não-paramétrica *Kruskal-Wallis*, seguida pelo teste *post hoc Student-Newman-Keuls*; estas análises foram realizadas no *software* livre BioEstat 5.0, Brasil. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$. Os resultados demonstrados no texto e nas tabelas estão expressos com suas respectivas médias \pm erros padrões.

Resultados

Os resultados da urinálise encontrados estavam de acordo com o esperado para cães saudáveis.

Os resultados médios das características do sêmen fresco foram: volume $2,0 \pm 0$ mL, concentração 285 ± 83 milhões de espermatozoides/mL e motilidade total $79 \pm 7\%$.

A avaliação da urina quanto à osmolaridade e aos componentes contidos nas tiras de urinálise (Tabela 1) demonstra a diferença na composição da urina dos cães.

As variáveis relacionadas ao movimento espermático apresentaram resultados semelhantes entre o ringer e diluições de ringer+urina $\leq 13\%$, durante a incubação do sêmen em banho-maria a 37°C , nas diferentes soluções por 20 minutos (Tabela 1).

Tabela 1 – Média \pm erro padrão das características do sêmen canino incubado por 20 minutos a 37°C, em diferentes diluições de urina com ringer simples (n=10).

Variáveis	ringer	urina 3%	urina 6%	urina 13%	urina 25%	urina 50%	urina pura
Motilidade total	63 \pm 10a	61 \pm 7a	47 \pm 7ab	46 \pm 9abc	26 \pm 6bcd	13 \pm 4d	8 \pm 3d
Motilidade progressiva	29 \pm 5ab	34 \pm 6ab	30 \pm 5ab	30 \pm 7b	14 \pm 4bc	5 \pm 2cd	0 \pm 0d
BCF (Hz)	22,3 \pm 1,8	21,3 \pm 1,2	21,4 \pm 1,3	21,8 \pm 1,7	18,2 \pm 2,7	22,6 \pm 4,1	10,2 \pm 4,3
STR (%)	85 \pm 3	83 \pm 3	83 \pm 2	84 \pm 4	76 \pm 9	71 \pm 12	42 \pm 14
VAP (μ m/s)	74,8 \pm 9,5a	75,6 \pm 7,5ab	67,7 \pm 4,9abc	69,8 \pm 7,0abc	45,5 \pm 8,3cd	19,9 \pm 4,3de	10,0 \pm 3,6e
VSL (μ m/s)	63,1 \pm 9,2a	64,7 \pm 8,1a	57,5 \pm 5,4a	59,9 \pm 6,8a	38,5 \pm 7,3ab	17,3 \pm 3,5bc	8,6 \pm 3,1c
Osmolaridade (mOsmol/L)	282 \pm 2a	311 \pm 4a	336 \pm 7b	388 \pm 15b	488 \pm 29c	650 \pm 55d	1047 \pm 110d

[†] letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre as médias dos tratamentos (p<0,05)

*Legenda: BCF – Frequência dos batimentos da cauda, STR – Retilinearidade, VAP – Velocidade do trajeto, VSL – Velocidade progressiva.

Tabela 2 – Média \pm erro padrão das características do sêmen canino contaminado com urina após o resfriamento por 24h, em diluidor à base de leite (n=10).

Variáveis	Ringer	Urina 3%	Urina 6%	Urina 13%	Urina 25%	Urina 50%	Urina pura
Motilidade total	53 \pm 7abc	66 \pm 5a	63 \pm 6ab	59 \pm 6abc	40 \pm 8bcd	27 \pm 7de	6 \pm 2e
Motilidade Progressiva	27 \pm 4a	32 \pm 4ab	33 \pm 5ab	29 \pm 5abc	15 \pm 4acd	9 \pm 3de	1 \pm 0e
BCF (Hz)	22,4 \pm 1,4	20,2 \pm 1,7	20,2 \pm 1,6	20,6 \pm 1,7	21,3 \pm 3,6	18,6 \pm 3,5	15,8 \pm 4,0
STR (%)	77,2 \pm 2	77 \pm 1	78 \pm 2	79 \pm 2	69 \pm 8	65 \pm 11	58 \pm 13
VAP (μ m/s)	82,0 \pm 6,5a	87,1 \pm 7,2a	86,9 \pm 6,6a	82,8 \pm 6,9ab	59,5 \pm 11,3abc	46,8 \pm 10,2cd	21,6 \pm 5,8d
VSL (μ m/s)	62,2 \pm 4,5a	67,1 \pm 5,6a	68,8 \pm 5,2ab	65,0 \pm 5,5ab	45,4 \pm 8,4ac	37,3 \pm 7,7cd	17,0 \pm 4,2d
HOST (%)	62,5 \pm 6,4	66,9 \pm 6,7	65,8 \pm 6,6	63,4 \pm 6,3	64,4 \pm 5,7	58,4 \pm 6,2	55,2 \pm 6,5

[†] letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre as médias dos tratamentos (p<0,05)

*Legenda: BCF – Frequência dos batimentos da cauda, STR – Retilinearidade, VAP – Velocidade do trajeto, VSL – Velocidade progressiva.

Os resultados obtidos após resfriamento das amostras incubadas em ringer e em diferentes soluções de ringer+urina, no diluidor Kenney (1975), por 24h, a 5°C, permitiram preservar a viabilidade espermática de células que foram submetidas previamente à solução de ringer+urina $\leq 25\%$ (Tabela 2).

Discussão

Os resultados médios da urinálise dos cães estão dentro do normal esperado para a espécie (REINE e LANGSTON, 2005), mas a osmolaridade variou entre 515-1455 mOsmol/L. Esta grande variação da osmolaridade indica que a urina é um fator não controlável sobre a viabilidade espermática, quando o sêmen entra em contato com a urina.

O ringer simples foi utilizado no presente estudo, pois é relatado na literatura como um meio adequado à manutenção da função espermática e por ter uma composição simples, com NaCl, KCl e CaCl₂, potencialmente pouco perigosa à aplicação intravesical e semelhante ao meio Cheng (TSAI et al., 1990).

Os resultados da motilidade total observados no presente trabalho, após 20 minutos de incubação (Tabela 1), são semelhantes àqueles encontrados por Griggers et al. (2001) para o sêmen equino em soluções de 0, 5, 10, 33 e 50% de urina em NaCl (0,9%).

Os efeitos da urina sobre todas as variáveis do movimento espermático avaliadas durante a incubação a 37°C, por 20 minutos, foram significativos a partir de concentrações $\geq 13\%$ de urina em ringer, quando a osmolaridade esteve próxima dos 500 mOsmol/l, considerados por Songsasen et al. (2002) como o limite de força osmótica em que o sêmen canino apresenta perdas significativas da motilidade. Para os equinos (GRIGGERS et al., 2001), a osmolaridade de 322 mOsmol/l já foi suficiente para causar alterações significativas da motilidade; o tempo de incubação do sêmen em diferentes concentrações de urina foi de 1 hora. Também, é importante considerar que os efeitos da urina sobre a motilidade espermática também são dependentes do tempo de permanência dos espermatozóides em um ambiente inadequado às suas necessidades fisiológicas (MAKLER et al., 1981).

Os resultados de Griggers et al. (2001) estão de acordo com o que foi observado neste trabalho, pois, a despeito de a centrifugação não ter sido maléfica aos

espermatozóides de ursos marrons (*Ursus arctos*) contaminados por urina (NICOLAS et al., 2011), somente esta técnica que separa os espermatozóides do meio contaminado com urina não é suficiente para mitigar os efeitos da urina; o diluidor Kenney à base de leite utilizado no presente trabalho foi suficiente para, além de conservar a funcionalidade das células que suportaram até 12,5% de urina, também restabelecer a funcionalidade de células que se encontraram em um ambiente significativamente mais hostil, com 25% de urina.

Os valores da motilidade total, motilidade progressiva, velocidade média do trajeto ($\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$), retilinearidade (%) e linearidade (%) encontrados por Martins et al. (2009) dos espermatozóides recuperados do epidídimo e diluídos em ringer sem lactato, antes do congelamento em Tris/ácido cítrico/amicacina/Orvus[®] WA Paste, foram semelhantes aos observados neste trabalho, após o resfriamento, e, embora os resultados de Martins et al. (2009) antes do congelamento não estejam disponíveis, é possível supor que o sêmen canino diluído em ringer e até 25% de urina também possa alcançar valores de ligação do espermatozóide ao oócito próximo a 50%.

Segundo Kimi-Diaka (1993), o resfriamento do sêmen canino a 5°C, por 24h, não causa qualquer alteração física ou funcional no espermatozóide canino. No presente trabalho, não foi observada qualquer alteração na funcionalidade dos espermatozóides, de acordo com o teste hiposmótico. Chirinéa et al. (2006) observaram reduções significativas na motilidade – 74,5% - e do HOST – 38,4%, após a refrigeração do sêmen canino a 5°C, por 60 min; embora a porcentagem de células espermáticas no presente trabalho seja superior ao de Chirinéa et al. (2006), a motilidade do sêmen diluído em ringer e, posteriormente, resfriado em Kenney não apresentou o mesmo desempenho. Cunha e Lopes (2000) observaram perdas significativas da motilidade e da integridade de membrana, após 48h de resfriamento em Kenney a 5°C.

Conclusões

O sêmen canino diluído em ringer simples e incubado por 20 minutos, a 37°C, apresentou os mesmos resultados, quando comparado ao sêmen diluído em ringer + 13% de urina. Após o processo de refrigeração com o diluidor à base de leite, a 5°C, por 24h, os espermatozóides que foram previamente incubados em ringer simples +

25% de urina apresentaram os mesmos resultados do grupo que foi incubado apenas em ringer simples. Finalmente, é possível afirmar que o sêmen contaminado com soluções de ringer simples com concentrações \leq 25% de urina e resfriado com o diluidor Kenney permanece viável por pelo menos 24h.

Agradecimentos

Ao Doutor Osvaldo Almeida Resende, pela contribuição na escolha dos testes estatísticos. Ao laboratório de Patologia Clínica da UENF, por nos ceder as tiras de urinálise. Ao CNPq, pelo auxílio financeiro, e à FAPERJ, pela bolsa de estudos.

Referências bibliográficas

BEAUFAYS, F.; ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. Retrograde ejaculation occurs in the dog, but can be prevented by pre-treatment with phenylpropanolamine: An urodynamic study. **Theriogenology**, v. 70, n. 7, p. 1057–1064, out. 2008.

BRASSESCO, M.; VISCASILLAS, P.; BURREL, L.; CALAF, J.; RAJMIL, O.; SERRA, J.M.P.; FARGAS, F.M. Sperm recuperation and cervical insemination in retrograde ejaculation. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 5, p. 923-924, mai. 1988.

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

CRICH, J.P.; JEQUIER, A.M. (1978) Infertility in men with retrograde ejaculation: the action of urine on sperm motility, a simple method for achieving antegrade ejaculation. **Fertility and Sterility**, v. 30, n. 5, p. 572-576, nov. 1978.

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

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

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

GOODROWE, K.L.; HAY, M.A.; PLATZ, C.C.; BEHRNS, S.K.; JONES, M.H.; WADDELL, W.T. Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1, p.299-308, out. 1998.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis, **Theriogenology**, v. 55, n. 3, p. 733-49, fev. 2001.

KIM, S.C.; KIM, H.W. Effects of nitrogenous components of urine on sperm motility: an in vitro study. **International Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 29-33, fev. 1998.

KOLB, E. (1987) **Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4ª edição. p. 612.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p.1279-89, jun.,1993.

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

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

MARTINS, M.M.; PADILHA, L.C.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Fertilizing Capacity of Frozen Epididymal Sperm Collected from Dogs. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, p. 342–344, jul. 2009. Suplemento 2.

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

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

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

REECE, W.O. (1996) Equilíbrio hídrico excreção. In: Dukes **Fisiologia dos animais domésticos**. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.856.

REINE J.R.; LANGSTON, C.E. Urinalysis Interpretation: How to Squeeze Out the Maximum Information from a Small Sample. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 20, n. 1 , p. 2-10, fev. 2005.

ROOT M.V.; JOHNSTON, S.D.; OLSON, P.N. Concurrent retrograde ejaculation and hypothyroidism in a dog: case report. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 593–600, fev. 1994.

SONGSASEN, N.; YU I.; MURTON, S.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa, **Cryobiology**, v. 44, n. 1, p. 79-90, fev. 2002.

TSAI, T.C., LIN, M.C., CHENG, C.J. (1990) A New Sperm Collection Method for treatment of Retrograde Ejaculation. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 89, n. 6, p.484-486, ju. 1990.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- O uso de estímulos sexuais sensoriais e hormonais previamente à eletroejaculação melhorou a motilidade do sêmen.
- O uso da combinação anestésica cetamina+xilazina, associada ao uso de um eletroejaculador com ondas senoidais, foi eficaz no controle da dor, em cães submetidos à coleta de sêmen por eletroejaculação.
- O sêmen contaminado com soluções de ringer simples com concentrações $\leq 25\%$ de urina e resfriado com o diluidor Kenney permanece viável por pelo menos 24h, a 5°C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAI, G.; KIHARA, K.; HYOUCHI, N.; MASUDA, H.; YONESE, J.; KOBAYASHI, T.; KAGEYAMA, Y.; SATO, K. Control of canine membranous urethra, bulbocavernosus and ischiocavernosus muscles by lumbosacral sympathetic pathways. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 104, n. 2, p. 10-116, mar. 2003.

BEAUFAYS, F.; ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. Retrograde ejaculation occurs in the dog, but can be prevented by pre-treatment with phenylpropanolamine: An urodynamic study. **Theriogenology**, v. 70, n. 7, p. 1057–1064, out. 2008.

BRASSESCO, M.; VISCASILLAS, P.; BURREL, L.; CALAF, J.; RAJMIL, O.; SERRA, J.M.P.; FARGAS, F.M. Sperm recuperation and cervical insemination in retrograde ejaculation. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 5, p. 923-924, mai. 1988.

BRINDLEY, G.S. Electroejaculation: its technique, neurological implications and uses. **Journal of Neurology, neurosurgery, psychiatry**, v. 44, n. 1, p. 9-18, jan. 1981.

CAZES, L. B. **Avaliação da eficiência de métodos de recuperação de gametas masculinos em cão doméstico (Canis familiaris)**. 2006. 68p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2006.

CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; TEBET, J.M.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D. Características morfofuncionais do sêmen canino resfriado e

congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 407-415, out./dez. 2006.

COOLEN, L.M.; ALLARD, J.; TRUITT, W.A.; MCKENNA, K.E. Central regulation of ejaculation. **Physiology & Behavior**, v. 83, n. 2, p. 203-215, nov. 2004.

CRICH, J.P.; JEQUIER, A.M. (1978) Infertility in men with retrograde ejaculation: the action of urine on sperm motility, a simple method for achieving antegrade ejaculation. **Fertility and Sterility**, v. 30, n. 5, p. 572-576, nov. 1978.

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

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

ESTIENNE M.J.; HARPER, A.F. Semen characteristics and libido in boars treated repeatedly with PGF2 {alpha.}. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 5, p.1494-98, mai. 2004.

FALK, A.; WALDNER, C. L.; COTTER, B.; GUDMUNDSON, J.; BARTH, A. D. Effects of epidural lidocaine anesthesia on bulls during eletroejaculation of bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 116-120, 2001.

FURMAM, J.W.; BALL, L.; SEIDEL, G.E. Electroejaculation of bulls using pulse waves of variables frequency. **Journal of Animal Science**, v. 40, n. 4, p.665-670, abr. 1975.

GOODROWE, K.L.; HAY, M.A.; PLATZ, C.C.; BEHRNS, S.K.; JONES, M.H.; WADDELL, W.T. Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1, p.299-308, out. 1998.

GOODWIN, M.; GOODING, K.M.; REGNIER, F. Sex pheromone in the dog. **Science**, v. 203, n. 4380, p.559-561, fev. 1979.

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

HASKINS, S.C.; PATZ, J.D.; FARVER, T.B. Xylazine and xylazine-ketamine in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 3, mar. 1986.

HESBACH, A.L. Techniques for objective outcome assessment. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, n. 4, p.146-154, nov. 2007.

HESS, M. Documental and anecdotal effects of certain pharmaceutical agents used to enhance semen quality in the dog. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 613-617, ago. 2006.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis, **Theriogenology**, v. 55, n. 3, p. 733-49, fev. 2001.

JOHNSTON, S.D.; WARD, D.; LEMON, J.; GUNN, I.; MACCALLUMB, C.A.; KEELEY T.; BLYDE, D. Studies of male reproduction in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 3, p. 338–55, ago. 2007.

KARAHAN, I.; TÜRK, G.; GÜR, S. In vitro effects of prostaglandin F₂ α and metamizol on the motility of diluted bull semen. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 30, n. 2, p. 271-278, 2006.

KIM, S.C.; KIM, H.W. Effects of nitrogenous components of urine on sperm motility: an in vitro study. **International Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 29-33, fev. 1998.

KIMURA, Y.; ADACHI, K.; KISAKI, N.; ISE, K. Role of alpha-adrenergic receptor mechanism in closure of the internal urethral orifice during ejaculation. **Urologia internationalis**, v. 30, n. 5, p. 341-349, 1975.

KOLB, E. (1987) **Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4ª edição. p. 612.

KOZINK, D.M.; ESTIENNE, M.J.; HARPER, A.F.; KNIGHT, J.W. The effect of lutalyse on the training of sexually inexperienced boars for semen collection. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 1039-45, set. 2002.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p.1279-89, jun. 1993.

KUSTRITZ, M.V.R.; HESS, M. Effect of administration of prostaglandin F2alpha or presence of an estrous teaser bitch on characteristics of the canine ejaculate. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 255-58, jan. 2007.

KUTZLER, M.A. Semen collection in the dog. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 747-54, ago. 2005.

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

LUNA, S.P.L.; NOGUEIRA, C.S.; CRUZ, M.L.; MASSONE, F.; CASTRO, G.B. Romifidine or xylazine combined with ketamine in dogs premedicated with methotrimeprazine. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 37, n. 2, 2000. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-

95962000000200001&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 31 de julho de 2011. doi: 10.1590/S1413-95962000000200001.

MAES, D.G.D.; MATEUSEN, B.; RIJSSELAERE, T.; De VLIEGHER, S.; Van SOOM, A.; de KRUIF, A. Motility characteristics of boar spermatozoa after addition of prostaglandin F_{2α}. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1435-1443, nov. 2003.

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

MARTINS, M.M.; PADILHA, L.C.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Fertilizing Capacity of Frozen Epididymal Sperm Collected from Dogs. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, p. 342–344, jul. 2009. Suplemento 2.

MASCARENHAS, R.M.; PAULA, T.A.R.; BITTENCOURT, V.L.; CARRETA JÚNIOR, MOACIR; BALARINI, M.K.; PEIXOTO, J.V. Parâmetros e congelabilidade de sêmen de Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). IN: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2007, Curitiba. Anais XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2007.

MASOUMI, R.; TOWHIDI, A.; JAVAREMI, A.N.; NABIZADEH, H.; ZHANDI, M. Cloprostenol injection improves reproductive characteristics in low libido Iranian Holstein bulls. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 11, n. 7, p.1027-1031, 2008.

MINTER, L.J.; DeLIBERTO, T.J. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p.1898–1912, dez. 2005.

MORTON, C.M.; REID, J.; SCOTT, M.; HOLTON, L.L.; NOLAN, A.M. Application of a scaling model to establish and validate an interval level pain scale for assessment of acute pain in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 12, p. 2154-2166, dez. 2005.

MOSURE, W.L.; MEYERS, R.A.; GUDMUNDSON, J.; BARTH, A.D. Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in bull. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 39, n. 8, p. 504-506, ago. 1998.

MURREL, J.C.; PSATHA, P.; SCOTT EM, REID J, HELLEBREKERS LJ. Application of a modified form of the Glasgow pain scale in a veterinary teaching centre in the Netherlands. **Veterinary Record**, v. 162, n. 13, p. 403-408, mar. 2008.

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

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

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

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

OHL, D.A.; SØNKSEN, J.; BRACKETT, N.L.; LYNNE. C.M. Electroejaculation **Current Sexual Health Reports**, v. 5, n. 1, p. 3-5, 2008.

OLAR, T.T.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Relationships Among Testicular Size, Daily Production and Output of Spermatozoa, and Extragonadal Spermatozoal Reserves of the Dog. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 1114-1120, 1983.

PALMER, C.W. Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 469-479, ago. 2005.

REECE, W.O. (1996) Equilíbrio hídrico excreção. In: Dukes **Fisiologia dos animais domésticos**. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.856.

REINE J.R.; LANGSTON, C.E. Urinalysis Interpretation: How to Squeeze Out the Maximum Information from a Small Sample. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 20, n. 1 , p. 2-10, fev. 2005.

REYNES-MORENO, C.; BOILARD. M.; SULLIVAN, R.; SIRARD. M. Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, n. 4, p. 500-509, dez. 2002.

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

ROMAGNOLI, S. Infertility in the male dog - A diagnostic approach. **Proceedings of the Veterinary Sciences Congress**, SPCV, Oeiras, Portugal. 2002:171-76.

ROOT M.V.; JOHNSTON, S.D.; OLSON, P.N. Concurrent retrograde ejaculation and hypothyroidism in a dog: case report. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 593–600, fev. 1994.

SANTOS, I.P. **Avaliação dos efeitos da urina, osmolaridade, pH e uréia sobre o espermatozóide canino**. 2007. p.51.Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2007.

SHIMIZU, Y.; YORIMITSU, A.; MARUYAMA, Y.; KUBOTA, T.; ASO, T.; BRONSON, R.A. Prostaglandins induce calcium influx in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 6, p. 555-561, jun. 1998.

SONGSASEN, N.; YU I.; MURTON, S.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa, **Cryobiology**, v. 44, n. 1, p. 79-90, fev. 2002.

SONKSEN, J.; OHL, D.A. Penile vibratory stimulation and electroejaculation in the treatment of ejaculatory dysfunction. **Internation Journal of Andrology**, v. 25, n. 6, p. 324-332, dez. 2002.

SOSTARIC, E.; AALBERTS, M.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.E. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 197, n. 3-4, p. 237-48, set. 2008.

STASIAK, K.L.; MAUL, D.; FRENCH, E.; HELLYER, P.W.; VANDEWOUDE, S. Species-Specific Assessment of Pain in Laboratory Animals. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science / American Association for Laboratory Animal Science**, v. 42, n. 4, p. 13-20, jul. 2003.

TRAAS, A.M.; KUSTRITZ, M.V.R. Effect of administering oxytocin or prostaglandin $F_{2\alpha}$ on characteristics of the canine ejaculate. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 12, p. 999-1002, dez. 2004.

TSAI, T.C., LIN, M.C., CHENG, C.J. (1990) A New Sperm Collection Method for treatment of Retrograde Ejaculation. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 89, n. 6, p.484-486, ju. 1990.

YESTE, M.; BRIZ, M.; PINART, E.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; CASAS, I.; BONET, S. Boar spermatozoa and prostaglandin $F_{2\alpha}$ Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin $F_{2\alpha}$ to the short-term extender over cooling time. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 1, p.180–195, out. 2008.

YONEZAWA A.; ANDO R.; WATANABE, C.; FURUTA, S.; KUTSUWA, M.; SAKURADA, S.; KIMURA, Y. Alpha2 - Adrenoceptor antagonistis: effects on

ejaculation, penile erection and pelvic thrusting behavior in dogs. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 70, n. 1, p. 141-147, set. 2001.