

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN
CONGELADO EM CÃES**

Viviane Helena Chirinéa

BOTUCATU – SÃO PAULO

2008

Viviane Helena Chirinéa

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN
CONGELADO EM CÃES**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes

BOTUCATU – SÃO PAULO

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Chirinéa, Viviane Helena.

Inseminação artificial com sêmen congelado em cães / Viviane Helena
Chirinéa. – Botucatu [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientadora: Maria Denise Lopes

Assunto CAPES: 50504002

1. Cão - Reprodução 2. Inseminação artificial

CDD 636.70824

Palavras-chave: Cães; Inseminação artificial; Sêmen congelado

VIVIANE HELENA CHIRINÉA

TÍTULO: INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN CONGELADO EM CÃES

DATA DA DEFESA: 06/06/2008

CONSTITUIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Denise Lopes

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade de Franca - Unifran

Prof^ª. Dr^ª. Isabel Cândia Nunes da Cunha

Membro

Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal

Universidade Estadual do Norte Fluminense

Prof^º. Dr^º. Frederico Ozanan Papa

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^º. Dr^º. Gilson Hélio Toniollo

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP - Jaboticabal

Dedico

Aos meus pais, Vicente e Wilma:

Vocês me transmitiram importantes valores: o RESPEITO, a HONESTIDADE, o PERDÃO, a PERSISTÊNCIA, a AMIZADE, e o AMOR a minha grande família.

AMO MUITO VOCÊS!!!

OBRIGADA!!!

AGRADEÇO

Primeiramente a **DEUS**, por me oferecer sabedoria, saúde e fé.

À **Prof^a. Maria Denise Lopes**, pela orientação, amizade, horas de conversa, confiança no meu trabalho, e pelos conselhos e apoios em decisões. Minha admiração pela profissional de elevada capacidade, a quem devo a oportunidade de grandes ensinamentos.

Aos professores **Papa, Eunice, Sony, Nereu, João, Fernanda, Meira e Marco** do Departamento de Reprodução Animal, que sempre estiveram à disposição para esclarecer qualquer dúvida na área. Obrigada pela convivência sempre muito agradável!

Aos funcionários: **Edílson, Cris, Valter, Márcio, D. Raquel e D. Cida**, pela amizade, carinho e ajuda no que foi preciso.

Aos funcionários **Sr. Luis e Zé Luis** do Canil do Hospital Veterinário da FMVZ/Botucatu. Obrigada pela limpeza do canil e cuidados com os cães.

À **Prof^a Eunice Oba** e ao mestrando **Moisés Calvo** pelo auxílio durante as dosagens de Progesterona no Laboratório de Endocrinologia da Reprodução. Obrigada pela dedicação e amizade.

Ao **Prof^o Carlos Padovani**, pelo auxílio e compreensão durante as análises estatísticas.

À **Prof.^a Regina Kiomi Takahira** do Laboratório Clínico Veterinário, pelos hemogramas realizados.

À amiga **Ana Augusta (Guta)**, por tantos momentos compartilhados, especialmente na fase mais árdua desse trabalho.

À minha grande amiga, **Fabiana F. de Souza**, pela experiência, auxílio, convivência e acima de tudo, amizade e admiração.

Ao amigo anestesista **Yuri (Bambi)**, agradeço as boas horas de convivência e pela anestesia das cadelas.

Ao amigo e companheiro, **Alexandre Bicudo**, pela amizade e auxílio nas ultra-sonografias das cadelas.

Aos amigo (as) da Reprodução Animal, que por muitas horas convivemos: **André, Bethania, Bió, Bruna, Carla e Gustavo, Carmo, Cassinha, Cely, Claudinha, Daniel, Daniela, Duroc, Fernanda, Gabriel (ex-residente), Gabriel Felício, Giovana, Guta, Heder, Ian e Lú, Ieda, Jeanne, Leandro, Liane, Liliam, Lú Leal, Márcio, Maria Clara, Ana Isabel, Moisés, Rodrigão, Rosiara, Thiago, Zé e Camila, Wolff.** Obrigada pela amizade! Vocês estarão sempre nas boas lembranças...

Aos amigos (as) de pós-graduação que passaram pelo Depto. de Reprodução Animal, e hoje seguem seus caminhos: **Maria Isabel (UEL), Fabiana, Marcelo Luz, Jussara, Carla, Bel Cunha, Priscila, Hymerson, Denise Leme, Silvio (Coruja), Chris Bahiana, Karina e Edinho, Edão, Claudinha e Marilu.**

As companheiras de entretenimento, **Bethania, Ieda, Guta e Bruna**, obrigada pelo apoio sempre, e pelas longas conversas nada produtivas. (rsrsrs)

Ao Laboratório **REPAS** (Reprodução de Pequenos Animais e Silvetres) pelas nossas grandes conquistas e convivência.

Aos amigos que muitas vezes não estavam presentes no dia a dia, mas nas boas horas de descontração e diversão: **Letícia e Gustavo, Renata, Luciana, Carol, Paulinho e Paulinha, Sildio e Tati, Paola, Nathália, Amir, Eder, Marquinho**. A vocês que sempre me fortaleceram, seja com o apoio nas horas difíceis, ou mesmo, com as risadas de finais de semana. Valeu!!!

Às amigas de “República”: **Marina, Maria Alice, Kinha, Dezza e Dani**, aquilo que vivemos, jamais voltará...

As **Cadelas** e aos seus respectivos **proprietários**, pela confiança em deixá-las aos meus cuidados. Sem ELAS nada teria acontecido.

Ao meu cão e grande amigo **BÓRIS**, pela cooperação nas colheitas do sêmen, pela nossa amizade e pelo nosso amor incondicional. Você fez parte da minha vida, tanto profissional como emocional, vivemos bons momentos de festa e alegria. SAUDADES ETERNA!!!

À minha família: **Papai e Mamãe**, meus irmãos e cunhados (as): **Mônica e Eduardo, Lú e Ana Lúcia, Cássia e Marcos, Junior e Chrys, Marcelo e Juliana**, meus sobrinhos (as): **Marcelo, Fábio, Giovana, Diego, Fernanda, Lucca, Matheus e Felipe**, que em todos os momentos me apoiaram e me fortaleceram sempre com muito carinho e amor. Obrigada por serem peças insubstituíveis na minha vida!

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem
momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas
incomparáveis.”

Fernando Pessoa

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

µL = Microlitro

µm = Micrometro

CASA = Computer-Assisted Semen Analyzer

CFDA = Diacetato de 6-Carboxifluoresceína

CV = Coeficiente de Variação

D0 = Dia 0 após onda de LH

D4 = Dia 4 após onda de LH

D5 = Dia 5 após onda de LH

D6 = Dia 6 após onda de LH

D7 = Dia 7 após onda de LH

DP = Desvio Padrão

FITC-PSA = Glutinina de *Pisum sativum* Conjugada a Isotiocianato de Fluorescência

FLUO = Porcentagem de Espermatozóides com Membrana Plasmática Íntegra na Coloração com CFDA/IP

FSH = Hormônio Folículo Estimulante

g = grama

IA = Inseminação Artificial

IAIU = Inseminação Artificial Intra-uterina

IP = Iodeto de Propídio

JC-1 = Iodeto de 5,5',6,6' – tetracloro – 1,1,3,3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

Kg = Quilograma

L = Litro

L. INF. = Limite Inferior

L. SUPE = Limite superior

LH = Hormônio Luteinizante

M1 = Momento 1 - pós-colheita

M2 = Momento 2 - pós-descongelamento

mL = Mililitro

MORFO = Porcentagem de Espermatozóides Morfologicamente Normais

mOsmol = Miliosmol

MT = Motilidade Total

MT. PROG. = Motilidade Progressiva

ng = Nanograma

nmol = Nanomolar

OEP = Orvus ES Paste®

OSH = Ovariohisterectomia

P4 = Progesterona

RAP = Porcentagem de Espermatozóides Rápidos

RIA = Radioimunoensaio

SDS = Dodecil Sulfato de Sódio

SRD = Sem Raça Definida

STR = Índice retilíneo

TRIS = Trishidroximetilaminometano

VAP = Padrão Médio de Velocidade Espermática

VG = Vesícula Germinativa

VIVOS = Porcentagem de Espermatozóides Vivos, no Teste Supra Vital (Eosina)

VSL = Velocidade de Deslocamento em Linha Reta

vs = versus

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Classificação dos espermatozoides de acordo com a coloração das estruturas. **Cabeça** (verde = membrana plasmática íntegra; vermelha = membrana plasmática lesada); **peça intermediária** (verde = baixo potencial de membrana mitocondrial; vermelha = alto potencial de membrana mitocondrial); e **acrossomo** (branco/incolor = acrossomo intacto sem reação acrossomal; verde = acrossomo lesado com reação acrossomal). Botucatu, 2008..... **39**

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1.** Correlação das concentrações de progesterona sérica com eventos reprodutivos da cadela. A margem de erro estimada foi aproximadamente ± 1 dia. Kustritz (2001)..... **43**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Taxas de gestação em cadelas submetidas a IA intravaginal ou intra-uterina, com sêmen congelado.....	35
TABELA 2.	Resultados das variáveis de Motilidade total (MT.), Motilidade progressiva (MT PROG.), porcentagens de espermatozóides vivos (VIVOS), integridade de membrana (FLUO), VAP, VSL, RAP, e porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais (MORFO), no momento pós-colheita (M1) de 6 ejaculados de um mesmo animal. Botucatu, 2008.....	46
TABELA 3.	Resultados das variáveis de Motilidade total (MT.), Motilidade progressiva (MT PROG.), porcentagens de espermatozóides vivos (VIVOS), integridade de membrana (FLUO), VAP, VSL, RAP, e porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais (MORFO), no momento pós-descongelação (M2) de 6 ejaculados de um mesmo animal. Botucatu, 2008.....	47
TABELA 4.	Coeficiente de variação (%) e limites de confiança das variáveis estudadas, de acordo com o momento de análise (M1 e M2). Botucatu, 2008.....	48
TABELA 5.	Resultado da avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozóides com a associação de sondas fluorescentes (IP, JC-1 e FITC-PSA), no momento pós-colheita (M1-1 a 8), de 6 ejaculados de um mesmo animal, de acordo com a classificação da Figura 1. Botucatu, 2008.....	49
TABELA 6	Resultado da avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozóides com a associação de sondas fluorescentes (IP, JC-1 e FITC-PSA), no momento pós-descongelação (M2-1 a 8), de 6 ejaculados de um mesmo animal, de acordo com a classificação da Figura 1. Botucatu, 2008.....	50

TABELA 7.	Distribuição (%) dos resultados da classificação dos espermatozóides quanto a associação de sondas fluorescentes (JC-1, IP e FITC-PSA), obtidos nos momento 1 (M1 – pós-colheita) e momento 2 (M2 – pós-descongelção) . Botucatu, 2008.....	50
TABELA 8.	Porcentagem de perdas das variáveis de Motilidade total (MT.), Motilidade progressiva (MT PROG.), porcentagens de espermatozóides vivos (VIVOS), integridade de membrana (FLUO), VAP, VSL, RAP, e porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais (MORFO) durante o processo de congelação/descongelção do sêmen, entre o momento 1 (pós-colheita) e 2 (pós-descongelção). Botucatu, 2008.....	51
TABELA 9.	Medidas de associação linear entre as variáveis de porcentagens de espermatozóides vivos (VIVOS), integridade de membrana (FLUO), e classificação 1 e 8 dos espermatozóides quanto a associação de sondas fluorescentes (JC-1, IP e FITC-PSA), segundo os momento 1 (M1 – pós-colheita) e momento 2 (M2 – pós-descongelção), e total dos 6 ejaculados. Botucatu, 2008.....	52
TABELA 10.	Análise descritiva dos resultados da análise do sêmen pós-descongelção (M2), concentração de progesterona e porcentagem de células superficiais, utilizados na IA intra-uterina, e resultados de gestação das fêmeas inseminadas. Botucatu, 2008.....	53
TABELA 11.	Análise descritiva dos resultados da análise do sêmen pós-descongelção, concentração de progesterona e porcentagem de células superficiais, utilizados na IA intravaginal e resultados de gestação das fêmeas inseminadas. Botucatu, 2008.....	54
TABELA 12.	Resultados referentes às dosagens de progesterona (RIA – ng/mL) e dos exames citológicos (% de células superficiais), diagnóstico de gestação (positivo + ou negativo -) e número de filhotes de 6 fêmeas nos dias das duas inseminações artificiais, intravaginal (A e B). Botucatu, 2008.....	55

- TABELA 13.** Resultados referentes às dosagens de progesterona (RIA – ng/mL) e dos exames citológicos (% de células superficiais), diagnóstico de gestação (positivo + ou negativo -) e número de filhotes de 6 fêmeas no dia da inseminação artificial intra-uterina. Botucatu, 2008..... **56**
- TABELA 14.** Medidas descritivas das variáveis de progesterona sérica (P4) dosadas por radioimunoensaio (RIA) e citologia vaginal (porcentagem de células superficiais), nos grupos 1 (IA intra-uterina) e 2 (IA intravaginal). Botucatu, 2008..... **56**
- TABELA 15.** Taxas de gestação obtidas em 12 fêmeas utilizando sêmen congelado/descongelado e duas técnicas de inseminação artificial, intra-uterina e intravaginal. Botucatu, 2008..... **57**

RESUMO

A inseminação artificial (IA) utilizando sêmen congelado é uma ferramenta importante na reprodução de cães, visa o melhoramento genético e melhor aproveitamento do reprodutor. Além disso, a melhor metodologia para avaliar o potencial fecundante de uma amostra de sêmen é o teste *in vivo*. Por isso, os objetivos deste trabalho foram determinar a taxa de gestação de cadelas, utilizando sêmen congelado em meio diluente TRIS/OEP/Frutose/8%Glicerol, e comparar duas técnicas de IA: intra-uterina, por laparotomia e intravaginal. O sêmen foi colhido de um único macho, por manipulação digital do pênis e analisado, imediatamente, após a colheita e após a descongelação a 70°C, por 8 segundos. A cinética do movimento foi verificada pelo CASA (Computer Assisted Semen Analyzer), e a integridade das membranas por: sondas fluorescentes (iodeto de propídio e carboxifluoresceína), pelo teste supra vital com a coloração de eosina, e pela associação de sondas (iodeto de propídio, JC-1 e FITC-PSA). A morfologia espermática foi avaliada por meio de esfregaços corados com Karras. A congelação do sêmen foi realizada pelo método descrito por Chirinéa et al. (2006). As fêmeas foram monitoradas desde o início da fase do proestro utilizando a citologia vaginal seriada e a dosagem de progesterona sérica, a cada 48 horas. Para as inseminações, as cadelas foram divididas em dois grupos: Grupo 1 (n=6) inseminadas uma única vez, via intra-uterina, por laparotomia, com uma dose inseminante de 160×10^6 espermatozoides/2mL; e Grupo 2 (n=6) inseminadas duas vezes, via intravaginal com uma dose inseminante de 160×10^6 espermatozoides/2 mL por inseminação. Os resultados das análises do sêmen pré e pós-descongelação não apresentaram diferenças significativas, com exceção da morfologia espermática e da associação de sondas fluorescentes. A taxa de gestação foi de 66,6% (4/6) no Grupo 1 e 16,6% (1/6) no Grupo 2. Em conclusão, o sucesso da inseminação artificial com sêmen congelado depende não só da qualidade do sêmen pós-descongelação, mas também da técnica de IA utilizada. No trabalho realizado, a técnica intra-uterina, por laparotomia, foi superior a intravaginal.

Palavras chaves: inseminação artificial, sêmen congelado, cães.

ABSTRACT

Artificial insemination (AI) using frozen semen is an important tool on dog's reproduction, aiming to genetic improvement and better use of a stud. Besides, the better way to evaluate the fecundate potential of a semen sample is an *in vivo* test. That way, the aim of this work was to determine the pregnancy rate in bitches, using TRIS/OEP/Fructose/8%Glycerol as the diluent medium, and to compare two AI techniques: intrauterine and intravaginal. Semen was collected from one male only, by digital manipulation. Semen was analyzed immediately after collection and after thawed at 70°C for 8 seconds. Movement kinetics were analyzed by CASA (Computer Assisted Semen Analyzer), membrane integrity using fluorescents probes (propidium iodide and carboxyfluorescein), supravital test, eosin staining, integrity of plasmatic, nuclear and mitochondrial membranes using the association of fluorescent probes (FITC-PSA, propidium iodide and JC-1) and sperm morphology. Semen was frozen using the method described by Chirinéa, 2006. Females were monitored since the beginning of proestrus, using vaginal smear and progesterone measurement, each 48hours. To inseminations, bitches were divided into two groups: Group 1, composed by 6 females, which were inseminated just once via intrauterine, with an insemination dose of 160×10^6 spermatozoids/2mL and Group 2 constituted by 6 females, which were inseminated twice, via intravaginal, using an insemination dose of 160×10^6 spermatozoids/2 mL/insemination. Results from semen analyses made before and after freezing did not show any difference, except for sperm morphology and association of fluorescents probes. Pregnancy rate was 66,6% (4/6) on Group 1 and 16,6% (1/6) on Group 2. In conclusion, the success of artificial insemination depends not only on semen quality after thawed, but also on the AI technique used. In our work, intrauterine technique by laparotomy was better than intravaginal.

Key-words: artificial insemination, frozen semen, dogs.

SUMÁRIO

	PÁGINAS
1. INTRODUÇÃO -----	19
2. OBJETIVOS -----	21
3. REVISÃO DA LITERATURA -----	22
a) Macho -----	22
b) Fêmea -----	29
c) Inseminação Artificial -----	32
4. MATERIAL E MÉTODOS -----	36
a) Local -----	36
b) Animais -----	36
c) Macho -----	36
- Colheita de Sêmen -----	36
- Análise do Sêmen -----	37
- Criopreservação do Sêmen -----	40
d) Fêmeas -----	41
- Citologia Vaginal -----	41
- Dosagem de Progesterona -----	42
e) Inseminação Artificial -----	43
f) Análise Estatística -----	45
5. RESULTADOS -----	46
6. DISCUSSÃO -----	58
7. CONCLUSÕES -----	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	70
ANEXOS -----	82

INTRODUÇÃO

Além de serem animais de companhia, os cães tem um importante papel como modelo experimental, permitindo o estudo e o aperfeiçoamento de processos biológicos e reprodutivos que podem ser aplicados aos canídeos selvagens; entretanto, diferenças entre as diversas espécies são vistas na biologia reprodutiva de canídeos e devem ser consideradas nas transferências de protocolos experimentais (SILVA et al., 2003).

O interesse nas técnicas de preservação da célula espermática e de inseminação artificial (IA) em cães está crescendo muito e novas tecnologias estão sendo estudadas em todo mundo. A taxa de gestação, após a IA, é considerada a melhor avaliação *in vivo* para testar a sobrevivência dos espermatozoides; é o teste mais definitivo da função espermática (KIM et al., 2007).

A técnica de IA, em cães, pode ser utilizada como um meio alternativo quando da impossibilidade de realização de cobertura natural, devido a problemas anatômicos, comportamentais e sanitários, ou ainda, quando da utilização de sêmen refrigerado ou congelado. A IA com sêmen congelado é a biotécnica de maior relevância, pois possibilita a manutenção da capacidade fecundante em animais de alto interesse zootécnico por tempo indeterminado, além de, minimizar o estresse causado pelo transporte das fêmeas para o acasalamento.

A IA com sêmen fresco ou refrigerado tem sido utilizada com resultados satisfatórios (FARSTAD, 1984; FARSTAD & BERG, 1989; LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989; LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1993). Porém, os resultados de IA com sêmen congelado, ainda são bastante heterogêneos (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989; SILVA, 1995; SANTOS, 2004). Esses resultados são devido a fatores relacionados, tanto as fêmeas, como aos machos. A variabilidade individual a criopreservação do sêmen em cães é um fator importante e tem como consequência uma baixa taxa de concepção com o sêmen descongelado. Já nas fêmeas um dos maiores problemas relacionados à técnica de IA é a dificuldade na detecção do momento ideal para IA, juntamente com a dificuldade na transposição cervical.

Outra importante particularidade da fisiologia da fêmea canina que afeta a fertilidade do sêmen congelado é que as cadelas liberam ovócitos imaturos, sendo necessário dois ou três dias para sua maturação completa e fecundação, criando dificuldades para a identificação segura do momento da ovulação e da inseminação artificial, portanto, a sobrevivência funcional das células espermáticas é um fator importante.

Vários métodos de IA são disponíveis atualmente, incluindo a IA intra-uterina por laparotomia, através do cateter norueguês ou por meio do endoscópio com fibra óptica, e a IA intravaginal (FARSTAD, 1984; FARSTAD & BERG, 1989; NOTHLING et al., 1995; TSUTSUI et al., 2000; KIM et al., 2007).

OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Avaliar a fertilidade do sêmen congelado de cães, utilizando um meio diluente a base de TRIS/Frutose/OEP/8%Glicerol e descongelado a 70° C por 8 segundos
- 2) Comparar as técnicas de IA intra-uterina, por laparotomia, e intravaginal, utilizando sêmen congelado, através das taxas de concepção.
- 3) Utilizar a associação de sondas fluorescentes (IP, JC-1 e FITC-PSA) na espécie canina para avaliação da integridade das membranas espermáticas.
- 4) Utilizar os resultados obtidos no exame citológico e na dosagem de progesterona sérica para determinar o melhor protocolo de IA nas cadelas.

Para excluir as diferenças individuais, foi usado apenas um cão como doador de sêmen após testes realizados em estudos preliminares.

REVISÃO DA LITERATURA

Os estudos sobre inseminação artificial (IA) em cães que descrevem resultados de fertilidade são os de Seager et al. (1975) com 156 IA com sêmen congelado/descongelado utilizando a inseminação intravaginal; Linde-Forsberg & Forsberg (1989 e 1993) com 470 e 527 IAs respectivamente, usando sêmen fresco, resfriado e congelado/descongelado por via intravaginal ou intra-uterina; Linde-Forsberg et al. (1999), com 327 IA com sêmen congelado/descongelado, comparando a IA intravaginal e intra-uterina; Linde-Forsberg (2000) relatou 2041 IA com sêmen fresco, resfriado, congelado/descongelado, usando IA intravaginal e intra-uterina; e Thomassem et al. (2001) com 312 IA utilizando sêmen congelado/descongelado principalmente por via intra-uterina.

Um grande número de fatores são importantes na determinação das taxas de êxito de IA em cães: a quantidade de vezes que a cadela foi inseminada durante a fase folicular do ciclo estral, a qualidade e o manejo do sêmen usado e a técnica de IA utilizada.

Para uma melhor compreensão desse texto optou-se por dividir essa revisão de literatura em três segmentos:

- 1) Macho – onde serão abordados aspectos da qualidade e dos procedimentos de congelação e descongelação do sêmen.
- 2) Fêmea – serão incluídos estudos a respeito da fisiologia reprodutiva das cadelas, momento ideal de IA
- 3) Inseminação Artificial – serão discutidas pesquisas relacionadas às técnicas de IA nas cadelas, taxas de gestação e prolificidade.

1) MACHOS

Durante o procedimento de congelação, muitos fatores podem influenciar a qualidade e a viabilidade do sêmen, incluindo a técnica de colheita de sêmen, o meio diluente, a concentração final de espermatozoides, o processamento do sêmen, a

combinação do meio diluente e as curvas de congelação durante a criopreservação, e o método de descongelação (PLATZ & SEAGER, 1977; LINDE-FORSBERG, 1991; ROTA et al., 1997, ROTA et al., 1998; LINDE FORSBERG et al., 1999; PENA & LINDE-FORSBERG, 2000; RIJSSELAERE et al, 2002, CUNHA e LOPES, 2005). Além disso, outro fator importante é a variação individual observada entre os cães e entre os ejaculados de um mesmo animal, tornando-os mais, ou menos resistentes aos procedimentos de congelação (HOLT, 2000; PENA et al., 2003).

Os princípios básicos de criopreservação celular incluem:

- Modificações físicas que ocorrem na membrana celular durante a refrigeração. Quando a célula espermática é resfriada abaixo da temperatura de sua fase de transição, a membrana plasmática se modifica, de um estado líquido cristalino para um estado de gel. Rearranjos nos lipídios e nas proteínas que fazem parte da membrana durante essa fase de transição podem provocar o choque térmico (HAMMERSTEDT et. al., 1990; AMANN, 1999).

- Alterações metabólicas devido à temperatura. De forma geral, o metabolismo celular é reduzido pela metade com uma queda de 10°C. Portanto, quando o espermatozóide tem sua temperatura reduzida de 39°C, temperatura corpórea, para 5°C, o metabolismo é reduzido para 10% do nível original. Quando as células são congeladas em temperaturas suficientemente baixas (-196°C) seu metabolismo cessa (HAMMERSTEDT et al., 1990; AMANN, 1999).

- Crioprotetores adicionados ao meio diluente aumentam a sobrevivência celular. Para proteger as células da crioinjúria, são geralmente adicionados aos meios diluentes, crioprotetores penetrantes, como o glicerol, que funciona ao mesmo tempo, como solvente e como soluto no meio. Quando aderidos ou removidos, induzem à alterações no volume celular, que podem romper as células (AMANN & PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; AMANN, 1999).

- A criopreservação afeta as células. Com o início do processo de congelação, que corresponde a uma fase de super resfriamento, a temperatura diminui para -5 a -15°C. Esta fase se inicia com a formação de cristais de gelo na solução extracelular, enquanto os componentes intracelulares permanecem descongelados

(HAMMERSTEDT et al., 1990). Com a contínua diminuição da temperatura, a célula é então exposta a uma condição hipertônica, desde que a água extracelular já se encontra congelada, e existe uma alta concentração de sal extracelular, causando ainda mais o efluxo de água de dentro da célula. O efluxo de água para fora da célula diminui a possibilidade de formação de cristais de gelo intracelular (HOLT, 2000). Com uma congelação lenta, a célula fica exposta por mais tempo a condição hiperosmótica, levando a danos irreparáveis. Essa condição hiperosmótica é também chamada de efeito soluto (HOLT, 2000).

- Remoção dos crioprotetores penetrantes. Após a descongelação, a osmolaridade da solução e o tamanho celular retornam ao normal (HAMMERSTEDT et al., 1990). Os crioprotetores penetrantes possuem uma taxa de difusão, através da membrana, menor que a água, e quando as células são diluídas num fluido livre de crioprotetor ou no fluido do trato reprodutivo da fêmea se forma um gradiente osmótico entre o interior da célula e o meio externo, induzindo a um aumento de volume celular. A extensão e a duração desse aumento de volume celular são dependentes da quantidade e da taxa de difusão desse crioprotetor (AMANN & PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; AMANN, 1999).

Desde que Dott & Foster (1979), iniciaram a avaliação computadorizada de espermatozóides em ejaculados de touros, garanhões, varrões, cobaias e carneiros há 29 anos, muitos sistemas para análise objetiva de espermatozóide canino tem sido testados (PENA & LINDE-FORSBERG, 2000; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001; PENA et al., 2003). O sistema de análise computadorizada do sêmen (CASA) permite uma determinação objetiva da concentração de espermatozóides; uma variedade de avaliações de parâmetros de motilidade; e análise de alterações morfológicas. Entretanto, cada sistema CASA necessita de uma padronização e validação relacionada à preparação do sêmen, a calibração e ajustes técnicos para fornecer resultados seguros e com repetibilidade (SCHAFER-SOMI & AURICH, 2007).

Devido à alta concentração de espermatozóides do sêmen canino *in natura*, diluições da fração principal (2ª fração) geralmente são necessárias para análise no CASA, entretanto, a diluição do sêmen podem causar alterações nos parâmetros de

motilidade e na integridade da membrana (SCHAFER-SOMI & AURICH, 2007). A viscosidade e a composição iônica dos meios diluentes, bem como as taxas de diluição e a temperatura podem influenciar a motilidade espermática (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

Muitos estudos demonstraram uma alta correlação entre a motilidade total, motilidade progressiva e concentração espermática analisados pelo sistema CASA e a avaliação convencional da motilidade, analisada pela microscopia de luz (GÜMZEL-APEL et al., 1993; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001; RIJSSELAERE et al., 2003)

A integridade das membranas dos espermatozoides caninos pode ser avaliada por diferentes métodos de coloração; entretanto, corantes fluorescentes tem se tornado o método de escolha. A coloração dupla com Diacetato de 6-Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP) (HARRISON & VICKERS, 1990; CUNHA e LOPES, 2005; SOUZA et al., 2007) bem como procedimentos de coloração tripla com SNARF, IP e FITC conjugado com PSA são métodos considerados satisfatórios. Avaliações de amostras coradas e analisadas por citometria de fluxo resultou em melhores resultados (PENA & LINDE-FORSBERG, 2000; PENA et al., 2003).

A integridade da membrana plasmática é essencial para a manutenção da capacidade fecundante dos espermatozoides. Até recentemente, a membrana plasmática do espermatozoide canino era rotineiramente avaliadas por corantes e observadas em microscópio de luz. O problema maior dessa tecnologia é que alguns espermatozoides podiam se corar apenas parcialmente, tornando difícil a interpretação dos resultados. Além disso, alguns componentes do meio diluente, como o glicerol ou glóbulos de gordura podiam interferir com essas colorações. Um método indireto para avaliar a integridade da membrana é pela exposição do espermatozoide a condições hipo-osmótica, desde que um número de espermatozoides com cauda enrolada/edemaciada mostrou ser inversamente proporcional ao número de espermatozoides com membranas rompidas (ENGLAND & PLUMMER, 1993; SCHAFER-SOMI & AURICH, 2007; SOUZA et al., 2007).

Durante a última década, sondas fluorescentes foram usadas e validadas para análise da integridade de membrana do espermatozoide de cães: CFDA em

combinação com IP (CUNHA et al., 1996; PENA et al., 1998b; CUNHA e LOPES, 2005; SOUZA, et al., 2007); SYBR-14 em combinação com IP; Carboxy-SNARF em combinação com IP e HOECHST 33258. Tanto o CFDA como o SYBR-14 são corantes permeáveis a membrana, não fluorescentes, e são rapidamente convertidos, por enzimas intracelulares, em fluorocromos verdes, altamente fluorescentes e impermeáveis à membrana. Essas sondas são então mantidas no interior das células por membranas intactas (PENA et al., 1998b). Após a morte da célula, os espermatozoides perdem sua habilidade para resistir ao influxo do corante fluorescente vermelho, IP, o qual substitui o CFDA ou SYBR-14. Membranas espermáticas viáveis ou intactas coram em verde fluorescente (CFDA, SYBR-14) enquanto que as membranas espermáticas rompidas coram as células em vermelho (IP) (PENA et al., 1998b; RIJSSELAERE et al., 2005)

Rijsselaere et al., (2002) compararam o SYBR-14/IP com a coloração de eosina/nigrosina e consideraram as sondas fluorescentes um método mais sensível, desde que porcentagens pequenas de membranas alteradas, causadas pela centrifugação, puderam ser detectadas por essa técnica fluorescente, mas não com a coloração convencional. Estudos prévios em bovinos, usando proporções conhecidas de espermatozoides viáveis e mortos, também confirmaram a eficiência da SYBR-14/IP para detectar espermatozoides mortos (CHALAH & BRILLARD, 1998).

Ainda são restritas as informações a respeito das relações existentes entre os resultados da análise computadorizada e o índice de fertilidade do sêmen analisado. Embora, um avanço substancial tenha ocorrido nas análises de sêmen de cão, surpreendentemente, poucos parâmetros foram correlacionados com a fertilidade *in vivo* (RIJSSELAERE et al., 2005).

O sêmen diluído de forma apropriada pode ser congelado por um tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante quando reaquescido e utilizado em uma IA de forma adequada (SILVA, 2007). Um diluente de sêmen deve conter nutrientes, um sistema tampão para ajuste do pH, deve promover uma pressão osmótica e manter uma concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos. O meio diluente deve proteger a célula contra o choque térmico e conter crioprotetores

que reduzam os danos às células espermáticas durante a congelação e posterior descongelação (CONCANNON & BATTISTA, 1989).

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$) é um álcool polihídrico, altamente permeável, com peso molecular de 92,10, sendo o crioprotetor mais empregado na congelação de sêmen nas diferentes espécies. Esse crioprotetor penetra a membrana celular através da difusão passiva, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma. Sua difusão é de 30 a 60 vezes mais lenta que a água (SILVA, 2007).

A concentração ideal de glicerol no diluente é aquela em que há uma predominância dos seus efeitos protetores sobre seus efeitos tóxicos. Essa concentração pode ser influenciada por outros componentes do diluente, pelo padrão de resfriamento, pelos métodos de congelação e descongelação, e pelas características seminais de cada espécie (SILVA, 2007).

Nos trabalhos realizados por Battista et al., (1989), Olar et al., (1989), e Thomas et al., (1993) o TRIS (Tris-hidroxymethyl-aminometano) foi o sistema tampão que melhor preservou melhor a motilidade espermática pós-descongelação. O TRIS é uma solução solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Ele permanece estável em temperatura ambiente por diversos meses, atuando com um tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0. O TRIS não apenas apresenta atividade tamponante, mas também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para preservação da sua energia (RODRIGUES, 1997; SILVA, 2007).

Alterações semelhantes à reação de capacitação resultam de eventos que desestabilizam a membrana plasmática dos espermatozoides e podem ser iniciados pelos procedimentos da criopreservação. A ocorrência desses eventos pode ser prevenida ou minimizada pela inclusão de mecanismos ou de substância que modifique a fluidez da membrana plasmática e proteja o espermatozoide. Os efeitos benéficos do detergente Dodecyl Sulfato de Sódio (SDS) sozinho ou como um componente do Equex STM Paste (Nova Chemical Sales) incluídos nos meios diluentes de congelação de sêmen de cão tem sido demonstrados pelos trabalhos de Thomas et al. (1992); Rota et al. (1997) e Pena et al. (1998a). Resultados dessas investigações

sugerem que esse composto aumenta a capacidade do sêmen descongelado de cães para se ligar à zona pelúcida de oócitos homólogos.

A maioria dos meios diluidores utilizados na criopreservação do sêmen canino contém glicose ou frutose (SILVA et al., 1996; HAY et al., 1997; ROTA, 1998; CHIRINÉA et al., 2003). Investigações iniciais sobre o metabolismo energético do sêmen fresco de cães, incubados em glicose ou frutose, indicaram que a frutose é mais eficiente que a glicose na obtenção de níveis energéticos. Além disso, existem indicações que a frutose possivelmente tenha uma função de fator ativador do espermatozóide após a ejaculação (RIGAU et al., 2000). Uma grande variedade na concentração de gema de ovo é descrita na preservação do sêmen canino. FOOTE & LEONARD (1964) reportaram o uso de diluidores com 20% de gema de ovo, e essa porcentagem parece ser o padrão usado por muitos autores (FONTBONNE & BADINAND; 1993, RODRIGUES-MARTINES et al., 1993; NÖTHLING et al., 1995; SILVA et al., 1996; SILVA, 2003).

A gema de ovo de galinha é adicionada aos diluentes de sêmen por proteger a membrana plasmática, restaurando os fosfolípidios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento inicial do sêmen (HAMMERSTEDT et al., 1990).

No estudo de Sanches et al. (2002) a motilidade espermática do sêmen a fresco em cães foi em média de 83,8%; quando congelado/descongelado com TRIS/Glicerol (8%) esse parâmetro apresentou média de 47,9% (10-70%). Cardoso et al. (2002) obtiveram com o diluente a base de água de coco, acrescido de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol, uma motilidade espermática média pós-descongelação de 56,7%. Silva et al. (2003) obtiveram 55,0% de motilidade espermática no sêmen fresco e 54,6% após a descongelação; nesse trabalho não houve diferença significativa entre a adição de glicerol em uma ou em duas etapas. Chirinéa et al. (2006) comparando dois meios diluentes de congelação, obtiveram resultados de motilidade de 67% em meio TRIS 8%Glicerol, com descongelação a 70°C por 8 segundos. Cardoso et al. (2006) utilizando diluente a base de água de coco e 6% de glicerol, obtiveram motilidade pós descongelação de 51,67% com uma taxa de diluição de 200×10^6 espermatozoides/mL.

2) FÊMEAS

As cadelas são classificadas como espécie monoéstrica e possuem ovulação espontânea. A atividade sexual desses animais é controlada pelos hormônios protéicos e esteróides, dividindo o ciclo estral em quatro fases. O anestro é referido como um período em que não há atividade ovariana. O proestro é caracterizado pelo alto nível de estrógeno e compreende o período em que a fêmea apresenta sinais de atração para o macho; é o período no qual os folículos ovarianos estão em crescimento. O estro compreende a fase na qual a fêmea aceita o macho, há aumento dos níveis séricos de progesterona com a ocorrência das ovulações, em geral, observada 24 a 72 horas após o pico de hormônio luteinizante (LH). No diestro há o domínio da progesterona e presença de corpos lúteos (CONCANNON et al.,1989).

A determinação da ovulação permite um melhor controle reprodutivo da fêmea, porém, a correlação entre as modificações físicas e as mudanças comportamentais entre o estro e tempo de ovulação não é precisa nas cadelas (GIER, 2006).

O uso de dosagens hormonais para reconhecimento da ovulação é bastante discutido. A onda pré-ovulatória do LH e a secreção do FSH estão intimamente relacionadas à ocorrência da ovulação, porém, a correlação entre essas gonadotrofinas é complexa, já que ocorre uma regulação diferencial da secreção de FSH e LH nas cadelas (REYNAUD et al., 2005).

Na cadela os ovócitos liberados medem $82,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$ e apresentam-se em um estado imaturo, no início da primeira divisão meiótica, ainda em estado de vesícula germinativa (VG), sendo também denominados de ovócitos primários, não podendo ser fecundados imediatamente após a sua liberação (ENGLAND & CONCANNON, 2002).

Ovócitos em estágio de VG estão presentes nas tubas uterinas, 44 horas após a ovulação, ou 2 dias após a onda pré-ovulatória de LH. A fase de metáfase I ocorre dentro de 44 a 48 horas da ovulação, sendo caracterizada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar. Na metáfase II, há a formação completa do segundo corpúsculo polar, observada 54 horas após a ovulação (LUVONI et al., 2006). A maturação nuclear

nas cadelas esta completa após 48 a 72 horas das ovulações, na presença de elevados níveis de progesterona (CONCANNON et al., 1989; REYNAUD et al., 2005), quando os ovócitos atingem a porção média das tubas uterinas.

Concannon & Verstegen (2005) descreveram a maturação ovocitária completa; nesse estudo a ocorrência das ovulações foi observada após 60 horas do surgimento da onda pré-ovulatória de LH, ou seja, no final da fase do proestro até a metade do estro. Houve uma correlação entre a ocorrência da ovulação e as alterações de comportamento, entretanto, a duração do proestro e do estro pode ser diferente entre os indivíduos o que dificulta a aplicação deste conceito. O processo da ovulação na maioria das cadelas completa-se com 24 horas, podendo em algumas fêmeas se completar em apenas 12 horas (FONTBONNE & MALANDAIN, 2006).

A detecção segura da ovulação é considerada por muitos autores, como um dos fatores mais importantes para determinação do momento ideal da IA nas cadelas. Isto é essencialmente importante quando se utiliza sêmen congelado, devido ao período relativamente curto de longevidade do sêmen descongelado no trato genital feminino, após a IA (LÉVY & FONTBONNE, 2007).

Nenhuma das avaliações clínicas, como o edema de vulva, a quantidade e o aspecto da secreção vaginal, o sinal de “Amantea”, ou a aceitação de monta pelo macho, são critérios suficientemente precisos para detectar a ocorrência e o dia da ovulação (ENGLAND & CONCANNON, 2002).

Não existe repetibilidade no dia da ovulação dentro do período de estro e conseqüentemente em protocolos de cobertura pré-determinados; algumas cadelas podem ovular tão cedo como no 5º dia do início do cio, e outras ao contrário, tão tarde como 30 após o início do cio. A mesma fêmea pode apresentar variações significativas no dia da ovulação em períodos de estro sucessivos (LÉVY & FONTBONNE, 2007).

É recomendado o uso de exames clínicos complementares para determinar com segurança, o momento da ovulação. A citologia vaginal não pode ser usada para detectar a ovulação prospectivamente. O exame citológico ele identifica com segurança o início da fase do diestro – diestro citológico; neste caso ocorre um aumento abrupto na porcentagem de células intermediárias e basais. Essa modificação

na aparência das células ocorre ao redor do 5º dia após a ovulação; mas esse critério pode ser usado para identificar a ovulação retrospectivamente. A endoscopia vaginal é realizada para determinar o período fértil, mas esse método requer um equipamento caro e também não identifica com segurança o dia da ovulação (ENGLAND & CONCANNON, 2002; SILVA et al., 2003; LÉVY & FONTBONNE, 2007)

Ensaio de LH seriam idéias em teoria, mas a determinação da onda pré-ovulatória de LH (D0) requerem no mínimo duas amostras de sangue por dia, por muitos dias, além disso, muitos países ainda não dispõem de técnicas comerciais para dosagem do LH (ENGLAND & CONCANNON, 2002; SILVA et al., 2003; LÉVY & FONTBONNE, 2007).

A dosagem de LH nas cadelas não é realizada rotineiramente, é dispendiosa e consome tempo, o que explica o fato de muitos pesquisadores optarem pela mensuração da progesterona sérica, para estimativa da ovulação. Uma concentração plasmática de progesterona de 2 ng/ml (16 nmol/L) corresponde ao dia 0 do ciclo estral e a onda pré-ovulatória de LH (KUSTRITZ, 2001; LOFSTEDT, 2004; REYNAUD et al., 2005; GIER, 2006).

A realização de exames citológicos seriados, desde o início do proestro, pode facilitar a determinação da onda pré-ovulatória de LH, segundo Feldman & Nelson (2004); uma contagem de 80% de células superficiais determina a concentração máxima de estrógeno (dia -2, da onda pré-ovulatória de LH). A mudança abrupta dos tipos celulares para parabasais e intermediárias indica o primeiro dia do diestro, correspondente ao dia +7 da onda pré-ovulatória de LH. O exame citológico é de fácil realização, porém, não determina com acurácia o dia da ovulação. A combinação das concentrações de progesterona, do LH, análise das células do epitélio vaginal e endoscopia vaginal são essenciais para facilitar a determinação da ovulação de uma forma mais confiável (ENGLAND & CONCANNON, 2002).

A dosagem de progesterona é uma prática rotineira que pode ser realizada com auxílio de *kits* semiquantitativos comerciais (ELISA) ou por laboratórios especializados que fornecem valores quantitativos obtidos por radioimunoensaio (RIA). Dosagens paralelas de progesterona e LH mostraram que o início da elevação significativa da

progesteronemia corresponde à onda pré ovulatória de LH, que pode ser uma referência importante para definirem-se as datas da IA, uma vez que a ovulação costuma ocorrer 48 horas após a onda de LH (SILVA et al., 2003).

Tem sido sugerido por England & Concannon (2002) que para estimar o dia de aparecimento da onda pré ovulatória de LH, devem-se utilizar as concentrações séricas de progesterona e de acordo com esses autores quando a progesterona excede 2,0 ng/mL (6,5 nmol/L) corresponde à onda pré ovulatória de LH, ou o dia seguinte.

Marseloo et al. (2004) demonstraram que os níveis plasmáticos de progesterona no momento da ovulação na maioria das raças é praticamente constante; portanto, as mensurações de progesterona é uma das técnicas mais eficientes para identificar as ovulações nas cadelas.

3) INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A primeira IA notificada cientificamente foi realizada no final do século XVIII por Spallanzani, que utilizou sêmen fresco obtido da vagina de uma cadela, naturalmente acasalada, e depositou-o na vagina de outra cadela, utilizando uma seringa. Esse procedimento resultou no nascimento de três filhotes, após 62 dias (JOHNSTON et al., 2001; SILVA et al., 2003).

Somente em 1954, foi descrita por Harrop a primeira IA com sêmen canino refrigerado a 4°C. Seager (1969) obteve a primeira gestação utilizando sêmen canino congelado, resultando no nascimento de dois filhotes.

Na atualidade, a IA nos cães pode ser realizada com sêmen fresco, refrigerado ou congelado; cada tipo de sêmen apresenta possibilidades distintas de aplicação, assim como também exige um manejo de complexidade diferente. A IA com sêmen congelado requer o desenvolvimento de metodologia adequada de congelação de sêmen. Sem dúvida, pesquisas realizadas nessa área indicam que em um futuro próximo estará disponível bancos de sêmen congelado (STORNELLI et al., 2001)

A IA pode ser realizada basicamente por duas técnicas: intravaginal e intra-uterina. A IA intravaginal consiste na deposição do sêmen na vagina da cadela e

apresenta-se como a via de escolha na maioria dos casos, por ser de fácil execução e por oferecer bons resultados. Neste caso pode se utilizar uma pipeta rígida, geralmente utilizada para IA em bovinos, ou a sonda de Osiris (SILVA et al., 2003).

A IA por via intra-uterina consiste na deposição do sêmen diretamente no interior do útero. Várias abordagens têm sido realizadas com o intuito de se desenvolver técnicas na qual a deposição do sêmen é realizada diretamente dentro do útero da fêmea, por via transcervical ou através de procedimentos cirúrgicos transabdominais, como a laparotomia e a laparoscopia (LINDE-FORSBERG, 2002; SILVA et al., 2003; WILSON, 2003).

A maioria dos autores tem obtido melhores resultados utilizando IA intra-uterina (mediante laparotomia, laparoscopia ou cateterismo cervical) com o uso de sêmen congelado. As porcentagens de prenhez obtidas com o uso de IA intra-uterina variam de 60 a 90% (WILSON, 1993; NOTHLING & VOLKMAN, 1993; SILVA et al., 1996; TSUTSUI et al., 2000; LINDE-FORSBERG, 2002; KIM et al., 2007). Os resultados obtidos por esses autores são muito variáveis e essa variação pode ser explicada pela utilização de diferentes meios diluentes, métodos de congelação, descongelação e envasamento utilizados.

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

Linde-Forsberg et al. (1999), obtiveram uma taxa de gestação de 57,9% usando IA intra-uterina com 100 a 400×10^6 espermatozóides. Tsutsui et al. (2000) realizaram IA intra-uterina com 100×10^6 espermatozóides em 10 fêmeas, resultando em uma taxa de gestação de 90%. Kim et al. (2007) demonstraram uma taxa de gestação de 100% após IA intra-uterina com baixo número de espermatozóides, 50×10^6 espermatozóides móveis e de 80% com 5×10^6 espermatozóides móveis, e 0% com 5×10^5 espermatozóides móveis.

Taxas de concepção usando sêmen congelado têm sido obtidas por algumas instituições de pesquisa usando como meios diluentes, o TRIS/gema de ovo/frutose/citrato (ANDERSEN, 1972; FONTBONNE & BADINAND, 1993; SILVA et al., 1996; ROTA et al., 1999), o Triladyl (NOTHLING et al., 1995), Laiciphos (SILVA & VERSTEGEN, 1995) e CLONE (STRÖN et al., 1997). A composição de alguns desses meios não são reveladas. Com relação ao local de inseminação, ambos intravaginal e intra-uterina são realizadas e uma alta taxa de concepção tem sido relatada em alguns desses trabalhos, entretanto, é reconhecido que a congelamento do sêmen de cão não é uma prática rotineira.

Procedimentos adequados de congelamento e descongelamento para o sêmen de cão poderiam resultar em um numero grande de doses inseminantes, de um ejaculado, mas o numero mínimo de espermatozoides normais necessários para uma ótima taxa de fertilidade não tem sido estudadas nos cães (KIM, et al., 2007).

Processo adequado de diluição, escolha correta de um meio diluente e de crioprotetores, tempo suficiente de equilíbrio, curva de congelamento/descongelamento apropriadas, com certeza, resultarão em uma porcentagem reduzida de espermatozoides com membrana espermática rompida e uma maior sobrevivência das células espermáticas no trato genital feminino. A manutenção da integridade estrutural e a fisiologia espermática constituem em fatores importantes que permitem a obtenção de altas taxas de gestação e ninhadas.

Com o desenvolvimento de métodos adequados para a criopreservação de sêmen, juntamente com a determinação do momento exato, de maior fertilidade do ciclo estral da fêmea e com o uso de uma técnica adequada de IA, essa biotécnica apresentará excelentes resultados no futuro (STORNELLI et al., 2001).

TABELA 1: Taxas de gestação em cadelas submetidas a IA intravaginal ou intra-uterina, com sêmen congelado.

Autor	Taxa de gestação (%)	
	Intravaginal	Intra-uterina
Fastard (1984)	--	64 a 69
Fontbonne e Badinand (1993)	52,6	73,6
Wilson (1993)	--	80
Linde-Forsberg (1995)	40 a 80	83 a 91
Silva et al. (1996)	--	60
Tsutsui et al. (2000)	0	90
Linde-Forsberg (2001)	34,6	52
Kim et al. (2007)	--	100

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL

O experimento foi realizado no Canil de Pesquisa da FMVZ e no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS) do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu.

ANIMAIS

Foram utilizados treze (13) animais, sendo:

- Um (1) macho, adulto (4 anos), da raça Boxer, com peso de 30Kg, proveniente de criatório particular, com paternidade recente comprovada, utilizado como doador de sêmen. O animal foi mantido em perfeitas condições de manejo higiênico-dietético e fora do alcance das fêmeas.
- Doze (12) fêmeas, adultas (2 a 5 anos), SRD, na fase folicular do ciclo estral, com peso variando entre 8 e 25Kg, provenientes de criatórios particulares. As fêmeas foram selecionadas entre aquelas, cujos proprietários, procuraram o Setor de Reprodução de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP/Botucatu para obtenção de informações sobre o procedimento de ovariectomia. Os animais triados foram mantidos em perfeitas condições de manejo higiênico-dietético. Durante o início da fase de proestro, período experimental da pesquisa, permaneceram no canil e foram alimentadas com ração seca peletizada e água *ad libitum*.

MACHO

COLHEITA DO SÊMEN:

O sêmen foi colhido por estimulação manual do pênis, na ausência de uma fêmea no estro. Foram colhidos seis (6) ejaculados do animal, com intervalo semanal, em funil plástico, acoplado a um tubo plástico graduado, aquecido ($\pm 35^{\circ}\text{C}$) e protegido da luz. Todo equipamento de colheita foi previamente limpo e esterilizado. A primeira

fração do sêmen foi desprezada, a segunda e parte da terceira frações foram utilizadas para as análises macroscópicas, microscópicas e processamento do sêmen.

ANÁLISES DO SÊMEN:

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi mantido em banho-Maria seco a 37°C e analisado.

ANÁLISES MACROCÓPICAS

- Volume:

Mensurado através da graduação do tubo utilizado na colheita em mL.

- Cor:

Determinada pela visualização direta, considerando a cor branca opalescente como normal.

ANÁLISES MICROCÓPICAS

- ANÁLISE DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO:

Foram avaliados por meio do CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer, HTR-IVOS 10 Analyzer, Hamilthon Thorne Research – Animal Version 12,0 L, Beverly, MA, USA), previamente ajustado para o sêmen de cão (**ANEXO 1**). Foram avaliados os seguintes parâmetros da cinética de movimento: motilidade total (MT), motilidade progressiva total (MP), padrão médio de velocidade espermática (VAP), velocidade de deslocamento em linha reta (VSL), porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP) (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001). Para as avaliações, uma gota de sêmen foi colocada em câmara de Makler (HTMA) aquecida e analisada à temperatura de 38°C. Para cada amostra de sêmen, três gotas foram avaliadas, e a média de três campos foi anotada.

- **CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA:**

Determinada através da contagem das células espermáticas em câmara hematómica de “Neubauer”, após diluição do sêmen total em água destilada (1:20). O número de espermatozoides expresso em mL foi multiplicado pelo volume do ejaculado, para determinação da concentração dos espermatozoides totais, e ainda multiplicado pela motilidade para determinação de espermatozoides totais e móveis.

- **AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA POR DUAS SONDAS FLUORESCENTES:**

A coloração fluorescente foi realizada de acordo com a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990), e adaptada ao cão por Cunha et al. (1996). As soluções estoques de diacetato de 6-carboxifluoresceína, iodeto de propídio, formaldeído e citrato de sódio a 3% foram preparadas (**ANEXO 2**). Uma alíquota de 10 µl de sêmen foi diluída em 40µl da solução de trabalho (**20 µl da solução estoque de diacetato de 6-carboxifluoresceína, 10 µl da solução estoque de iodeto de propídio, 10 µl de solução estoque de formaldeído e 960 µl de citrato a 3%**), preparada no momento do uso. Após 10 minutos da diluição, uma gota do material foi depositada entre lâmina e lamínula e analisada em microscópio de epifluorescência (NIKON – Episcopic Fluorescence Attachment “EFA” HalogenLamp Set) com objetiva de 40x. Foram contadas 100 células e classificadas como:

- Células com membrana íntegra: células coradas em verde fluorescente.
- Células com membrana lesada: células coradas em vermelho ou em verde fluorescente e vermelho.

- **MORFOLOGIA ESPERMÁTICA:**

Foram confeccionados esfregaços do sêmen em lâminas, fixadas em Formol salino a 37°C por 10 minutos, após secagem, coradas pelo método de Karras modificado (PAPA et al., 1986). Foram avaliadas 100 células de cada esfregaço e as alterações espermáticas classificadas de acordo com Mies Filho (1987). Os resultados foram expressos em porcentagem de células normais.

- AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL, E FUNÇÃO MITOCONDRIAL POR TRÊS SONDAS FLUORESCENTES:

Para as avaliações da integridade das membranas foram utilizadas, em associação, três sondas fluorescentes, sendo elas: Iodeto de Propídio (**IP**), FITC-PSA (**glutínina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína**) e JC-1 (**Iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina**) como descrito por Celeghini (2005). A preparação das soluções de estoque e de trabalho para cada sonda fluorescente se encontra no **ANEXO 3**.

A preparação das amostras para avaliação simultânea foi realizada em tubo plástico de 1,5 mL, onde uma alíquota de 50 µL de sêmen foi diluída em 100 µL de solução preparada (**10 mL de solução fisiológica + 100 µL de piruvato e pH=6,8**), incubada a 37°C por 10 minutos, logo após, foram adicionados a solução 1,5 µL de Iodeto de Propídio, 1,0 µL de JC-1 e, após 8 minutos de incubação a 37°C, 25 µL de FITC-PSA. Uma gota da amostra foi depositada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C, e analisada em microscópio de epifluorescência (NIKON – Episcopic Fluorescence Attachment “EFA” HalogenLamp Set) utilizando objetiva de 100x. Foram avaliadas 100 células e as alterações espermáticas classificadas de acordo com a Figura 1.

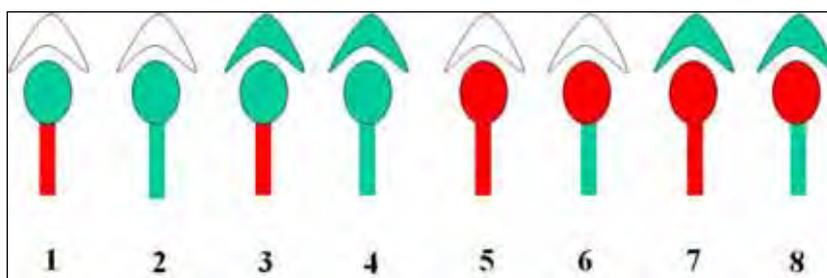


FIGURA 1: Classificação dos espermatozoides de acordo com a coloração das estruturas. **Cabeça** (verde = membrana plasmática íntegra; vermelha = membrana plasmática lesada); **peça intermediária** (verde = baixo potencial de membrana mitocondrial; vermelha = alto potencial de membrana mitocondrial); e **acrossomo** (branco/incolor = acrossomo intacto sem reação acrossomal; verde = acrossomo lesado com reação acrossomal). Botucatu, 2008.

- **TESTE SUPRA VITAL:**

A preparação foi realizada com uma gota de sêmen e uma gota de eosina (**1 g de Eosina em 100 mL de Solução de Citrato de Sódio a 2,95%**), homogeneizadas e confeccionado esfregaço. A leitura foi realizada em microscópio de luz (400x). Os espermatozóides que se apresentavam corados de vermelho foram considerados com membrana lesada e mortos, já os que não se coraram foram considerados com membrana íntegra e vivos. O resultado foi expresso em porcentagem de vivos.

Foram realizadas duas avaliações das amostras de sêmen: após a colheita (**M1**) e após descongelação (**M2**) para todas as variáveis descritas.

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN:

O sêmen foi criopreservado de acordo com a técnica descrita por Chirinéa et al. (2006): após as análises iniciais (M1), o sêmen foi centrifugado a 800xg por 10 minutos, o *pellet* diluído com o meio TRIS/OEP/Frutose/8%Glicerol (**ANEXO 4**), e imediatamente envasado em palhetas francesas de 0,5 mL, com concentração de 40×10^6 espermatozóides móveis por palheta. As palhetas foram então, transferidas para um refrigerador programado a 5°C (MINITUB®) por 60 minutos. Transcorrido o período de equilíbrio, as palhetas foram transferidas para o vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos, e então mergulhadas e armazenadas.

Após o procedimento de congelamento, o sêmen foi armazenado em botijão criogênico, até a seleção, monitoração e caracterização do momento ideal de inseminação artificial das fêmeas.

O sêmen foi descongelado a 70°C por 8 segundos (PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000) e as amostras foram avaliadas *in vitro* e *in vivo*. Apenas uma palheta de cada partida foi descongelada para avaliação do sêmen (M2).

AValiação *IN VITRO*: motilidade e vigor espermático (CASA), concentração espermática, morfologia espermática, integridade das membranas espermática por meio do teste supra vital e sondas fluorescentes.

AValiação *IN VIVO*: foi realizada por meio da IA - intra-uterina e intravaginal - em fêmeas previamente selecionadas e monitoradas para identificação do melhor momento para a IA.

FÊMEAS

Foram monitoradas diariamente a partir do momento em que se identificaram os primeiros sinais de início da fase folicular do ciclo estral, edema de vulva, secreção sanguinolenta e atração pelo macho. A partir do início do proestro, foram realizados exames citológicos e colheitas de sangue para dosagem de progesterona, a cada 48 horas, até o início da fase de diestro.

- **CITOLOGIA VAGINAL:**

As fêmeas foram contidas convenientemente e após limpeza da região vulvar foi introduzido um espéculo vaginal; em seguida, foi utilizada uma escova ginecológica – citobrush – introduzida o mais profundamente possível na vagina e rotacionada, facilitando dessa forma a coleta do material. A escova foi retirada e o material imediatamente transferido para uma lâmina histológica, previamente limpa e identificada. O material foi corado com Panótico. (Hematocor®). A identificação dos tipos celulares foi baseada nos critérios adotados por Johnston et al. (2001), ou seja, avaliada baseando-se na porcentagem de células superficiais sob microscopia de luz (aumento de 200x).

Foram contadas 100 células e quando quantificadas 80% de células superficiais/escamas foi considerado o dia -2 do ciclo estral, ou seja, quando as concentrações de estrógeno atingiram os níveis mais elevadas na circulação (FELDMAN & NELSON, 1996).

- DOSAGEM DE PROGESTERONA:

As amostras de sangue foram colhidas através de venopunção da veia jugular em tubos, sem anticoagulante, a cada 48 horas. Foram retirados 5,0 mL de sangue com seringas de 10,0 mL e agulhas 30 x 08. O sangue foi centrifugado (centrífuga Excelsa Baby – 206R – FANEM®) por 4 minutos, para obtenção do soro. O soro foi dividido em duas alíquotas: uma foi imediatamente enviada, via SEDEX, para dosagem de progesterona por quimioluminescência para o Laboratório CAD (Centro Avançado em Diagnóstico, Londrina, PR), e a segunda foi armazenada em freezer a - 20°C, para posterior dosagem de progesterona em radioimunoensaio (RIA), no Laboratório de Endocrinologia da Reprodução, no Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – Unesp/Botucatu, utilizando *kit* comercial (Diagnostics Procedure Corporation – progesterone Coat - a – Count, Los Angeles, USA) em fase sólida, sem extração química ou processo de purificação, validado para plasma canino (SRIKANDAKUMAR et al., 1986). As dosagens foram realizadas de acordo com a recomendação do fabricante. A cada 10 tubos de amostra e no final de cada ensaio foi utilizado um tubo controle, em duplicata, com os internos de 0,5 ng/mL e 20 ng/mL, para cálculo dos coeficientes de variação intra-ensaio (2,83%). As contagens foram realizadas em Contador Gamma. Todas as amostras foram mensuradas em duplicadas.

Para correlação das concentrações de progesterona sérica com os eventos reprodutivos da cadela foi usado o esquema proposto por Kustritz, (2001) (Quadro 1).

QUADRO 1: Correlação das concentrações de progesterona sérica com eventos reprodutivos da cadela. A margem de erro estimada foi aproximadamente ± 1 dia. Kustritz (2001).

Evento	Progesterona Sérica (ng/mL)
Anestro/proestro	< 1,0
Ovulação menos 3 dias	1,0 a 1,9
Ovulação menos 2 dias	2,0 a 2,9
Ovulação menos 1 dia	3,0 a 3,9
Dia da ovulação	4,0 a 10,0
Ovulação mais 2 dias – dia ótimo para cobertura	--
Ovulação mais 1 a 5 dias	> 10,0 / epitélio vaginal cornificado

As dosagens de progesterona sérica foram usadas em conjunto com a citologia vaginal para determinação do momento mais adequado para a realização da IA. O dia 0 do ciclo estral (D0) foi considerado quando a concentração de progesterona variou entre 2,0 a 2,9 ng/mL.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Foram considerados 2 grupos:

GRUPO 1: Inseminação artificial intra-uterina, após laparotomia.

Após os procedimentos adequados de anestesia (**via intramuscular = 0,05mg/Kg de Acepromazina + 0,5mg/Kg de Morfina, após 10 minutos via intravenosa = 5mg/kg Quetamina + 0,25mg/kg de Diazepan, e manutenção em Halotano**), as cadelas, desse grupo, foram submetidas à técnica de laparotomia e exposição dos cornos uterinos. A amostra de sêmen, previamente descongelada, após

análise espermática, foi dividida em duas partes e depositada por meio de seringa, acoplada a um cateter nº18, nos dois cornos uterinos. Após, a região do corpo de útero foi comprimida com auxílio dos dedos, por cerca de 5 minutos, para impedir o refluxo. Nesse grupo foi realizada apenas uma (1) inseminação artificial, nos dias **D3, D5, D6 ou D7** do ciclo estral. A dose inseminante total utilizada foi de 160×10^6 espermatozoides, em dois (2)mL - (4 palhetas).

GRUPO 2: Inseminação artificial intravaginal.

O sêmen foi depositado na vagina cranial, com auxílio de uma pipeta rígida para IA (Provar®). Após os procedimentos adequados de limpeza da região vulvar, foi introduzida uma pipeta rígida, o mais profundamente na vagina, com movimentos cuidadosos, até ser encontrada uma resistência. Em seguida, o sêmen foi depositado no fundo da vagina com a pipeta acoplada a uma seringa de vidro, contendo a amostra de sêmen descongelada.

Após a inseminação artificial, a fêmea permaneceu com os membros posteriores elevados por 10 minutos para facilitar a introdução do sêmen no útero. Nesse grupo foram realizadas duas (2) inseminações, com intervalo de 48 horas cada. As inseminações foram realizadas entre os dias **D4 e D8** do ciclo estral. A dose inseminante foi de 160×10^6 espermatozoides por inseminação, com um volume de dois (2)mL, totalizando 320×10^6 espermatozoides em quatro (4)mL, nas 2 inseminações.

Após 30 dias das inseminações artificiais, foi realizado exame de ultra-som (Logic 3, com transdutor linear 10 MHz) para diagnóstico de gestação. Em seguida, as fêmeas foram submetidas à ovariosterectomia (OSH). Apenas uma (1) fêmea com prenhez positiva foi acompanhada durante toda a gestação, parto, lactação e crescimento do filhote.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise de variância para o modelo de medidas repetidas, complementada com o Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni (ZAR, 1999). Todas as discussões dos resultados foram realizadas no nível de 5% de significância.

Para a comparação dos momentos M1 - após a colheita de sêmen e M2 - após a descongelação foi realizado o Teste T pareado, expressos pelos limites de 95 % de confiança. O Teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais (GOODMAN, 1964, 1965) foi utilizado para a obtenção dos resultados de distribuição das respostas à associação de sondas fluorescentes.

O estudo da associação linear entre as variáveis que avaliaram a integridade da membrana plasmática foi realizado utilizando-se o coeficiente de correlação linear de Pearson (NORMAN & STREINER, 1994).

RESULTADOS

MACHOS

Foram congeladas 90 palhetas de 0,5 mL, contendo 40×10^6 espermatozoides móveis, em cada uma. O sêmen foi analisado imediatamente após a colheita (M1 - Tabela 2) e após o procedimento de congelação/dcongelação (M2 - Tabela 3).

TABELA 2: Resultados das porcentagens das variáveis de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), porcentagens de espermatozoides vivos (VIVOS), integridade de membrana (FLUO), padrão médio de velocidade espermática (VAP), velocidade de deslocamento em linha reta (VSL), porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP), e porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais (MORFO), no momento pós-colheita (M1) de 6 ejaculados de um mesmo animal. Botucatu, 2008.

EJACULADO	MT (%)	MP (%)	VIVOS (%)	FLUO (%)	VAP	VSL	RAP	MORFO (%)
1	84	81	93	90	129,9	114	83	95
2	84	80	100	73	148,2	132,5	82	97
3	89	83	92	88	127,1	108,8	85	93
4	88	85	61	77	162,6	150,1	86	91
5	91	86	90	90	134,2	116,9	88	94
6	89	82	72	94	160,8	145,5	89	94
Média	88	83	85	85	144	128	86	94
DP	2,9	2,3	15	8,3	16	17	2,7	2
% CV	3,3	2,8	18	9,8	11	14	3,2	2,1

TABELA 3: Resultados das porcentagens das variáveis de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), porcentagens de espermatozoides vivos (VIVOS), integridade de membrana (FLUO), padrão médio de velocidade espermática (VAP), velocidade de deslocamento em linha reta (VSL), porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP), e porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais (MORFO), no momento pós-descongelamento (M2) de 6 ejaculados de um mesmo animal. Botucatu, 2008.

EJACULADO	MT (%)	MP (%)	VIVOS (%)	FLUO (%)	VAP	VSL	RAP	MORFO(%)
1	80	61,5	74	72	129,9	79,8	74	63
2	82	78	80	58	93,4	83,3	79	40
3	76	67	73	70	81,8	73,2	67	34
4	74	66	48	61	84,8	74,9	68	62
5	79	73	72	72	92,2	81,3	74	55
6	78	69	57	75	96,4	78,5	72	60
Média	78	69	67	68	96	79	72	52
DP	2,9	5,8	12	6,8	17	3,8	4,4	12
% CV	3,7	8,3	18	10	18	4,9	6,1	24

Os resultados de coeficiente de variação (%CV), das variáveis estudadas, entre o sêmen analisado após a colheita (M1) e descongelado (M2) estão descritos na Tabela 4.

Comparando-se os valores das variáveis estudadas nos 2 momentos (M1 e M2), foi observado uma redução significativa ($P < 0,05$) apenas na porcentagem da morfologia espermática (Tabela 4).

TABELA 4: Coeficiente de variação (%) e limites de confiança das variáveis estudadas, de acordo com o momento de análise (M1 e M2). Botucatu, 2008.

VARIÁVEL	MOMENTO 1			MOMENTO 2			p=Valor
	CV (%)	L. INF (95%)	L. SUPE (95%)	CV (%)	L. INF (95%)	L. SUPE (95%)	
MT (%)	3,29	0,86	5,73	3,66	0,95	6,36	p>0,05
MP (%)	2,80	0,73	4,87	8,35	2,17	14,52	p>0,05
VIVOS (%)	17,58	4,57	30,58	18,06	4,70	31,42	p>0,05
FLUO (%)	9,77	2,54	16,99	10,06	2,62	17,51	p>0,05
VAP	10,89	2,83	18,95	17,94	4,67	31,22	p>0,05
VSL	13,55	3,52	23,57	4,89	1,27	8,51	p>0,05
RAP	3,20	0,83	5,57	6,10	1,59	10,61	p>0,05
MORFO (%)	2,13 ^a	0,55	3,70	23,58 ^b	6,13	41,03	p<0,05

Limites de 95% de confiança para o coeficiente de variação, expresso em porcentagem (ZAR, 1999)

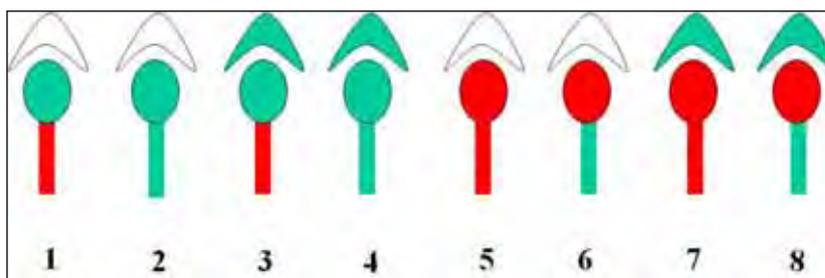


FIGURA 1: Classificação dos espermatozoides de acordo com a coloração das estruturas. **Cabeça** (verde = membrana plasmática íntegra; vermelha = membrana plasmática lesada); **peça intermediária** (verde = baixo potencial de membrana mitocondrial; vermelha = alto potencial de membrana mitocondrial); e **acrossomo** (branco/incolor = acrossomo intacto sem reação acrossomal; verde = acrossomo lesado com reação acrossomal). Botucatu, 2008.

TABELA 5: Resultado da avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides com a associação de sondas fluorescentes (IP, JC-1 e FITC-PSA), no momento pós-colheita (M1-1 a 8), de 6 ejaculados de um mesmo animal, de acordo com a classificação da Figura 1. Botucatu, 2008.

EJACULADO	CLASSIFICAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES QUANTO A ASSOCIAÇÃO DE SONDAS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	80	3	0	5	0	6	0	6
2	79	8	1	0	0	0	0	12
3	81	0	0	1	2	2	3	11
4	73	0	0	18	0	0	1	8
5	84	6	0	3	0	3	0	4
6	80	2	0	6	0	3	0	9
Média	80	3,2	0,2	5,5	0,3	2,3	0,7	8,3
DP	3,6	3,3	0,4	6,5	0,8	2,3	1,2	3
% CV	4,6	103	245	119	245	96	182	36

TABELA 6: Resultado da avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozóides com a associação de sondas fluorescentes (IP, JC-1 e FITC-PSA), no momento pós-descongelamento (M2-1 a 8), de 6 ejaculados de um mesmo animal, de acordo com a classificação da Figura 1. Botucatu, 2008.

EJACULADO	CLASSIFICAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES QUANTO A ASSOCIAÇÃO DE SONDAS							
	1 	2 	3 	4 	5 	6 	7 	8 
1	12	0	2	18	2	11	10	45
2	9	0	0	15	0	24	0	52
3	20	15	0	3	0	23	0	39
4	0	0	4	18	5	9	6	58
5	15	2	0	16	6	9	2	50
6	13	0	1	13	8	12	1	52
Média	12	2,8	1,2	14	3,5	15	3,2	49
DP	6,7	6	1,6	5,6	3,3	6,9	4	6,6
% CV	58	212	137	41	95	47	127	13

TABELA 7: Distribuição (%) dos resultados da classificação dos espermatozóides quanto a associação de sondas fluorescentes (JC-1, IP e FITC-PSA), obtidos no momento 1 (M1 – pós-colheita) e momento 2 (M2 – pós-descongelamento) . Botucatu, 2008.

Momento	CLASSIFICAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES QUANTO A ASSOCIAÇÃO DE SONDAS							
	1 	2 	3 	4 	5 	6 	7 	8 
M1	477 (79,50) ^{b,D}	19 (3,17) ^{a,B}	1 (0,17) ^{a,A}	33 (5,50) ^{a,B}	2 (0,33) ^{a,A}	14 (2,33) ^{a,A,B}	4 (0,67) ^{a,A}	50 (8,33) ^{a,C}
M2	69 (11,50) ^{a,B}	17 (2,38) ^{a,A}	7 (1,17) ^{a,A}	83 (13,83) ^{b,B}	21 (3,50) ^{b,A}	88 (14,67) ^{b,B}	19 (3,17) ^{b,A}	295 (49,33) ^{b,C}

Letras minúsculas: comparação de momentos, fixados a classificação dos espermatozóides (coluna). $p < 0,05$

Letras maiúsculas: comparação da classificação dos espermatozóides, dentro do mesmo momento (linha). $p < 0,05$

Em relação aos resultados obtidos com o uso da associação das três sondas fluorescentes, entre os momentos M1 e M2, observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os espermatozoides classificados com 1, 4, 5, 6, 7 e 8.

TABELA 8: Porcentagem de perdas das variáveis de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), porcentagens de espermatozoides vivos (VIVOS), integridade de membrana (FLUO), padrão médio de velocidade espermática (VAP), velocidade de deslocamento em linha reta (VSL), porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP), e porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais (MORFO) durante o processo de congelação/descongelação do sêmen, entre o momento 1 (pós-colheita) e 2 (pós-descongelação). Botucatu, 2008.

VARIÁVEIS	MOMENTO 1	MOMENTO 2	% PERDA
MT (%)	88	78	11,37
MP (%)	83	69	16,90
VIVOS (%)	85	67	21,18
FLUO (%)	85	68	20,00
VAP	144	96	33,33
VSL	128	79	38,29
RAP	86	72	16,28
MORFO (%)	94	52	44,68

$$\% \text{ Perda} = \frac{M2 - M1}{M2} \times 100\%$$

TABELA 9: Medidas de associação linear entre as variáveis de porcentagens de espermatozoides vivos (VIVOS), integridade de membrana (FLUO), e classificação 1 e 8 dos espermatozoides quanto a associação de sondas fluorescentes (JC-1, IP e FITC-PSA), segundo os momento 1 (M1 – pós-colheita) e momento 2 (M2 – pós-descongelação), e total dos 6 ejaculados. Botucatu, 2008.

ASSOCIAÇÃO (%)	MOMENTO		TOTAL
	M1	M2	
VIVOS X FLUO	- 0,030 (p>0,05)	- 0,017 (p>0,05)	0,434 (p>0,05)
VIVOS X CLASSIF. 1	0,665 (p>0,05)	0,595 (p>0,05)	0,634 (p<0,05)
VIVOS X CLASSIF. 8	0,146 (p>0,05)	- 0,616 (p>0,05)	- 0,614 (p<0,05)
FLUO X CLASSIF. 1	0,610 (p>0,05)	0,649 (p>0,05)	0,824 (p<0,001)
FLUO X CLASSIF. 8	- 0,483 (p>0,05)	- 0,463 (p>0,05)	- 0,820 (p<0,001)
CLASSIF.1 X CLASSIF. 8	- 0,294 (p>0,05)	- 0,862 (p>0,05)	- 0,989 (p<0,001)

Coeficiente de Correlação de Pearson (p – valor)

TABELA 10: Análise descritiva dos resultados da análise do sêmen pós-descongelamento (M2), concentração de progesterona e porcentagem de células superficiais, utilizados na IA intra-uterina, e resultados de gestação das fêmeas inseminadas. Botucatu, 2008.

VARIÁVEL	INSEMINAÇÃO INTRA-UTERINA					
	GESTAÇÃO POSITIVA				GESTAÇÃO NEGATIVA	
	1 Lessie	2 Pit	3 Pantera	4 Paloma	1 Neguinha	2 Estrela
MOTILIDADE TOTAL (%)	79	79	79	76	74	78
VIVOS (%)	72	72	72	73	48	57
FLUORESCÊNCIA (%)	72	72	72	70	61	75
CLASSIFICAÇÃO 1 (%) (IP, JC-1 e FITC-PSA)	15	15	15	20	0	13
CLASSIFICAÇÃO 8 (%) (IP, JC-1 e FITC-PSA)	50	50	50	39	58	52
PROGESTERONA (ng/mL)	20,00	21,39	27,70	19,81	19,35	7,53
CÉLULAS SUPERFICIAIS (%)	83	94	95	100	55	98
DIA DA IA (DO = pico de LH)	D5	D6	D5	D6	D7	D3

TABELA 11: Análise descritiva dos resultados da análise do sêmen pós-descongelamento, concentração de progesterona e porcentagem de células superficiais, utilizados na IA intravaginal e resultados de gestação das fêmeas inseminadas. Botucatu, 2008.

VARIÁVEL	INSEMINAÇÃO INTRAVAGINAL					
	GESTAÇÃO POSITIVA	GESTAÇÃO NEGATIVA				
	1 Branca	1 KuKa *	2 Bella *	3 Meg	4 Ozama *	5 Pithy *
MOTILIDADE TOTAL (%)	78	81	78	76	77,2	81
VIVOS (%)	57	77	76,5	73	66,7	77
FLUORESCÊNCIA (%)	75	65	64	70	68,7	65
CLASSIFICAÇÃO 1 (%) (IP, JC-1 e FITC-PSA)	13	10,5	14,5	20	11,7	10,5
CLASSIFICAÇÃO 8 (%) (IP, JC-1 e FITC-PSA)	52	48,5	45,5	39	48	48,5
PROGESTERONA (ng/mL) 1ª IAIV	29,69	31,60	19,59	20,67	16,90	13,49
PROGESTERONA (ng/mL) 2ª IAIV	29,80	34,51	33,28	31,12	20,77	33,15
CÉLULAS SUPERFICIAIS (%) 1ª IAIV	100	90	95	98	67	90
CÉLULAS SUPERFICIAIS (%) 2ª IAIV	86	90	95	76	67	80
DIA 1ª IAIV (D0 = pico de LH)	D5	D6	D5	D5	D4	D5
DIA 2ª IAIV (D0 = pico de LH)	D7	D8	D7	D7	D6	D8

*Representa valores médios das variáveis do sêmen descongelado utilizado nas duas IA realizadas

FÊMEAS

Os resultados referentes às dosagens de progesterona e citologia vaginal para a determinação do momento adequado da inseminação artificial encontram-se nas Tabelas 12, 13 e 14.

TABELA 12: Resultados referentes às dosagens de progesterona (RIA – ng/mL) e dos exames citológicos (% de células superficiais), diagnóstico de gestação (positivo + ou negativo -) e número de filhotes de 6 fêmeas nos dias das duas inseminações artificiais, intravaginal (A e B). Botucatu, 2008.

CADELAS	P4	CITOLOGIA VAGINAL	GESTAÇÃO	Nº FILHOTES
1A	13,49	90	-	0
1B	33,15	80	-	0
2A	31,60	90	-	0
2B	34,51	90	-	0
3A	19,57	95	-	0
3B	33,28	95	-	0
4A	20,67	98	-	0
4B	31,12	76	-	0
5A	16,90	67	-	0
5B	20,77	67	-	0
6A	29,69	100	+	5
6B	29,80	86	-	0

A=1ª IAIV e B=2ªIAIV

TABELA 13: Resultados referentes às dosagens de progesterona (RIA – ng/mL) e dos exames citológicos (% de células superficiais), diagnóstico de gestação (positivo + ou negativo -) e número de filhotes de 6 fêmeas no dia da inseminação artificial intra-uterina. Botucatu, 2008.

CADELAS	P4	CITOLOGIA VAGINAL	GESTAÇÃO	Nº FILHOTES
1	19,35	55	-	0
2	21,39	94	+	4
3	20,00	83	+	1
4	19,81	100	+	1
5	27,70	95	+	8
6	7,53	98	-	0

TABELA 14: Medidas descritivas das variáveis de progesterona sérica (P4) dosadas por radioimunoensaio (RIA) e citologia vaginal (porcentagem de células superficiais), nos grupos 1 (IA intra-uterina) e 2 (IA intravaginal). Botucatu, 2008.

VARIÁVEL	MEDIDA DESCRITIVA	GRUPO DE INSEMINAÇÃO			RESULTADO DO TESTE ESTATÍSTICO
		INTRA-UTERINA	INTRAVAGINAL (1ªIA)	INTRAVAGINAL (2ªIA)	
P4 (ng/mL)	VALOR MÍNIMO	7,53	13,49	20,77	p=0,021
	MEDIANA	19,91	20,12	32,14	
	VALOR MÁXIMO	27,70	31,60	34,51	
	MÉDIA	19,30 ^{a(1)}	21,99 ^{a,b}	30,44 ^b	
	DESVIO PADRÃO	6,55	7,18	5,03	
CITOLOGIA VAGINAL (%)	VALOR MÍNIMO	55,00	67,00	67,00	p=0,608
	MEDIANA	94,50	92,50	83,00	
	VALOR MÁXIMO	100,00	100,00	95,00	
	MÉDIA	87,50	90,00	82,33	
	DESVIO PADRÃO	16,98	11,98	10,13	

(1) Duas médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si (P>0,05)

TABELA 15: Taxas de gestação obtidas em 12 fêmeas utilizando sêmen congelado/descongelado e duas técnicas de inseminação artificial, intra-uterina e intravaginal. Botucatu, 2008.

TÉCNICA DE INSEMINAÇÃO (IA)	TAXA DE GESTAÇÃO (%)	RESULTADO DO TESTE ESTATÍSTICO p = VALOR
IA INTRA-UTERINA	66,67 (4/6)	p = 0,0207
IA INTRAVAGINAL	16,67 (1/6)	

Foi evidenciada uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre a deposição de sêmen descongelado intra-uterina e intravaginal.

DISCUSSÃO

A possibilidade da utilização do sêmen canino criopreservado abriu novas fronteiras para criação de cães, permitindo a troca de material genético de alto valor zootécnico entre localidades distantes e o armazenamento desse material por períodos indefinidos (STORNELLI et al., 2001; SILVA et al., 2003; LINDE-FORSBERG, 2001).

Os espermatozoides dos cães respondem a criopreservação de forma diferente que aqueles de outras espécies domésticas, freqüentemente, com baixas taxas de concepção e alta variabilidade individual (ENGLAND, 1993; YU et al., 2002). Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de otimizar diferentes aspectos da criopreservação do sêmen canino, incluindo variações nos meios diluentes, tipo de crioprotetores, concentração espermática, métodos de congelação (FOOT, 1964; BATTISTA et al., 1989; OLAR et al., 1989; ROTA et al., 1997). Além disso, muitos protocolos empregados em cães foram desenvolvidos de forma empírica ou modificados de métodos utilizados em outras espécies.

Atualmente, a maioria dos métodos de congelação de sêmen canino segue o procedimento descrito por Andersen (1975); nesse método a diluição do sêmen é realizada a 37°C, com meio diluente a base de TRIS, gema de ovo e glicerol, envasado em palhetas plásticas, submetidas à temperatura de refrigeração por 3 horas e em seguida, expostas aos vapores de nitrogênio para congelação. A metodologia de congelação de sêmen utilizada nesse trabalho seguiu a descrita por Chirinéa et al. (2006), onde a diluição do sêmen foi realizada a temperatura ambiente, com o meio diluente a base de TRIS, gema de ovo, frutose, OEP e 8% de glicerol. O envase foi realizado em palhetas de 0,5 mL, contendo uma concentração de 40×10^6 espermatozoides móveis. As amostras foram submetidas a uma temperatura de 5°C por 60 minutos, expostas ao vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos, e em seguida, mergulhadas em nitrogênio.

A metodologia de congelação de sêmen descrita por Chirinéa et al. (2006) mostrou resultados satisfatórios de avaliações *in vitro*, estimulando o uso desse método para testes de avaliação *in vivo*.

Devido ao fato do cão apresentar uma grande variação individual relacionada à qualidade seminal e a uma resposta também individual ao processo de criopreservação, optou-se nesse estudo, pelo uso de apenas um macho, como doador de sêmen. Essa escolha permitiu que os resultados de IA fossem analisados sem a influência do macho.

Além da variabilidade individual, existe uma variação na qualidade do sêmen entre ejaculados; em vista disso, optou-se por analisar o coeficiente de variação (%CV) dos seis ejaculados utilizados nesse experimento. Os resultados estatísticos mostraram um CV de 2,1 a 18% no sêmen pós-colheita (M1) e de 3,7 a 24% no sêmen pós-descongelação (M2). Na dependência das condições experimentais um CV de até 30% é considerado aceitável, portanto, as variáveis do experimento responderam dentro dos valores desejados e caracterizaram, portanto, uma amostra homogênea (Tabelas 2 e 3).

Os resultados obtidos de congelação de sêmen do cão escolhido como doador foram satisfatórios, desde que as diferenças observadas entre os momentos de pós-colheita (M1) e pós-descongelação (M2) foram apenas significativas para a morfologia espermática (94% vs 52%). Em relação às demais perdas resultantes do processo de congelação/descongelação (Tabela 8) foram demonstradas uma perda de 11,3% de motilidade total, 20,0% de integridade de membranas avaliadas por CFDA e IP, e 44,6% de morfologia espermática.

Chirinéa et al. (2006) descreveram resultados de perdas de motilidade total ao redor de 25,1% e de integridade de membrana plasmática de 59,7%, entre o sêmen fresco e descongelado, utilizando as mesmas sondas fluorescentes e trabalhando com 10 cães.

A técnica de congelação de sêmen utilizado nesse experimento foram os mesmos de Chirinéa et al. (2006), portanto as diferenças de perdas observadas nos dois trabalhos isenta a metodologia como responsável pelos resultados,

demonstrando claramente a influência da variação individual dos cães na qualidade e na sensibilidade a criopreservação. Este resultado reforça nossa decisão em trabalhar com apenas um animal como doador de sêmen, que além de mostrar uma boa qualidade seminal, demonstrou ser um animal cujas células espermáticas apresentaram uma boa resposta ao processo de congelação/descongelação.

Outro fator importante que explica a obtenção de resultados diferentes de perdas no trabalho de Chirinéa et al. (2006) foi a utilização de técnicas de avaliação de motilidade espermática total. Em nossa pesquisa, as amostras de sêmen foram avaliadas por um sistema computadorizado "Hamilton Thorn" (CASA) ajustado para a espécie canina. A possibilidade de avaliar o sêmen com técnicas objetivas aumenta a efetividade e a segurança dos resultados, pois um número maior de células são analisadas e essa análise não depende apenas da experiência do profissional (PENA & LINDE-FORSBERG, 2000; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001; PENA et al., 2003; SCHAFFER-SOMI & AURICH, 2007).

Confrontando os resultados de motilidade espermática total após o processo de congelação/descongelação de sêmen obtidos nesse trabalho com os resultados de diversos autores observou-se uma superioridade dos nossos resultados: Pena & Linde-Forsberg (2000) 65%; Weiss et al., (2000) 65%; Cunha e Lopes, (2001) mediana de 40%; Sanches et al. (2002) 47,9%; Cardoso et al. (2002) 56,7%; Silva et al. (2003) 54,6%; Martins (2004) $54,9 \pm 14,2$ durante a estação do verão; Cunha e Lopes (2005) 40%; Cardoso et al. (2006) 51,67%; Chirinéa et al. (2006) 67%; Kim et al. (2007) 64,9%; Michael et al. (2007) 49,75%; e Pinto & Kozink (2008) 28%.

Essas diferenças de motilidade espermática total observada pós-descongelação, são devidas a métodos de congelação e meios diluentes diferentes; inclusão ou não de antioxidantes nos meios diluentes; curvas de congelação diversas; diferentes crioprotetores empregados; diversas concentrações de espermatozóides nas palhetas e também pelo fato de nossos resultados representarem apenas ejaculados de um mesmo doador.

Os resultados de morfologia espermática mostraram uma diferença significativa entre os dois momentos avaliados, M1 e M2. É reconhecido que o

processo de criopreservação causa alterações na morfologia dos espermatozóides, e nesse trabalho houve uma diferença entre o sêmen pós-colheita e pós-descongelção de 44,68%; essas alterações ocorreram principalmente na porcentagem de defeitos maiores, relacionados ao acrossomo. Esses mesmo resultados foram obtidos por Rijsselaere et al (2005). Alguns defeitos na região da cabeça do espermatozóide podem afetar a fertilidade, e alguns desses defeitos, entretanto, podem ser compensados com o aumento na concentração espermática durante a IA; ao contrário, outros defeitos não são compensados com o aumento na concentração espermática (MOCÉ & GRAHAM, 2008).

A integridade da membrana plasmática é essencial para a capacidade fertilizante do espermatozóide. Até recentemente, a membrana plasmática dos espermatozóides era rotineiramente avaliada por microscopia de luz, usando corantes supra vitais, como eosina/negrosina. Além da dificuldade na interpretação dos resultados a adição de meios diluentes interferiam na coloração e prejudicavam a leitura.

Embora a membrana plasmática dos espermatozóides envolva toda a célula, ela recobre três compartimentos distintos: a membrana acrossomal externa, a porção pós-acrossomal da cabeça espermática, e a peça intermediária e principal (MOCÉ & GRAHAM, 2008). A maioria dos métodos que analisa a integridade da membrana avalia apenas se a membrana é intacta ou lesada. Por isso, atualmente a integridade da membrana plasmática é avaliada com uma associação de corantes fluorescentes, onde é possível se diferenciar sub-populações espermáticas, com diferentes características funcionais (vivos, lesados, semi-lesados).

Nossos resultados de integridade de membrana, utilizando a associação de sondas fluorescentes (CELEGHINI, 2005), demonstraram que o sêmen pós-colheita era constituído por uma população espermática de 80% de espermatozóides íntegros (acrossomo intacto/não reagido, membrana plasmática íntegra e alto potencial mitocondrial – classificação 1), após o processo de congelção essa população foi reduzida para apenas 12 %.

Ao contrário, no sêmen pós-colheita 8,3% representavam as células espermáticas lesadas (acrossomo lesado/reagido, membrana plasmática lesada e baixo potencial mitocondrial – classificação 8); no sêmen pós-descongelamento essa população passou para 49%, representando um aumento importante na porcentagem de células espermáticas lesadas.

Já a integridade de membrana quando avaliada pelas sondas CFDA e IP (CUNHA et al., 1996), mostrou resultados bastante próximos entre os dois momentos avaliados M1 e M2 (85% vs 68%). Esses resultados contradizem as avaliações pós-descongelamento realizadas com a associação das três sondas fluorescentes, onde apenas 12% das células se mantiveram íntegras, contra 68% observadas nas sondas CFDA e IP. Alterações na função e na estrutura da membrana espermática, durante a congelamento/descongelamento resultam em uma reduzida população de espermatozoides viáveis, móveis e morfológicamente normais, capaz de efetivamente se ligar e penetrar a zona pelúcida.

A avaliação da associação linear entre todos os testes realizados para análise da integridade da membrana espermática (Tabela 9) não apresentou uma associação entre as diversas variáveis quando se considerou o sêmen pós-colheita (M1) e o sêmen pós-descongelamento (M2), entretanto, quando se verificou o total das amostras, ou seja, a somatória dos momentos, foi evidenciado uma associação positiva e significativa entre as porcentagens de vivos e a classificação 1 da associação das sondas; uma associação negativa e significativa entre as porcentagens de vivos e a classificação 8 da associação das sondas; uma associação positiva, expressiva e significativa entre a sonda CFDA/IP e a classificação 1 da associação das sondas; uma associação negativa, expressiva e significativa entre a sonda CFDA/IP e a classificação 8 da associação das sondas; e uma associação negativa, expressiva e significativa entre as classificações 1 e 8 da associação das sondas.

Provavelmente, a não existência de associação entre os momentos estudados M1 e M2 se deve ao número pequeno de amostras de cada momento (n=6); já com a somatória dos momentos, ficou evidente a associação entre os testes, reforçando a sensibilidade e a confiabilidade dessas análises. A associação negativa, mais expressiva

foi entre a classificação 1 e 8 da associação de sondas, o que seria o esperado, uma vez que se trata de células espermáticas integras e lesadas. Outras associações expressivas foram entre a sonda CFDA/IP e a classificação 1 e 8 da associação das sondas; uma associação positiva com a classificação 1 e negativa com a classificação 8, também conforme o esperado. As associações entre o teste vivo e morto, usando o corante Eosina, apresentou uma associação com as demais sondas, mas uma associação não expressiva, indicando a inferioridade dessa técnica quando comparada com as demais.

Poucos estudos nos cães têm correlacionado características espermáticas com a fertilidade *in vivo*. A fecundação é o resultado de várias reações, e testes laboratoriais que avaliam uma única função espermática, são improváveis de predizer com segurança o potencial de fertilidade de um animal; já, uma combinação de testes sobre a qualidade espermática, provavelmente apresentará uma maior correlação com a fertilidade *in vivo*. A dificuldade no estabelecimento de correlações entre testes laboratoriais e fertilidade *in vivo* nos cães é devido ao número limitado de coberturas por cão, em comparação com outras espécies, e a uma alta incidência de falha na concepção, devido a protocolos errados de cobertura.

Os cães domésticos são conhecidos como uma espécie fértil, com uma taxa de gestação maior ou igual a 85% sob condição de cobertura natural e controlada. A contribuição do macho para estudos de fecundidade se relaciona com uma sobrevivência espermática por longos períodos no trato reprodutivo da fêmea, após cobertura natural. Entretanto, quando métodos de IA são usados, essa contribuição é drasticamente reduzida com uma longevidade espermática menor que 24 horas.

Outra problemática na obtenção de sucesso da IA na espécie canina está diretamente ligada às dificuldades concernentes à determinação do momento ideal para IA nessa espécie de fisiologia reprodutiva particular (SILVA et al., 2003; LÉVY & FONTBONNE, 2007).

Uma determinação segura da ovulação nas cadelas é complexa e deve-se, em parte, a dificuldade na identificação da onda pré-ovulatória de LH, considerado o marco zero do ciclo estral. Todos os eventos comportamentais, físicos e hormonais, vistos na fase folicular do ciclo estral, dependem e mantêm uma relação fechada com

a onda pré-ovulatória de LH (REYNAUD et al., 2005; FONTBONNE & MALANDAIN, 2006).

As ovulações nas cadelas ocorrem de dois a três dias após o início do estro e nesse momento a progesterona sérica apresenta uma concentração de 4 a 10ng/mL, e de 10 a 25ng/mL dois dias após a ovulação, quando os oócitos atingem sua maturidade na ampola das tubas uterinas e estão aptos a serem fecundados (KUSTRITZ, 2001; ROMAGNOLI, 2002), portanto, o conhecimento das concentrações de progesterona assumem um papel preponderante no manejo de coberturas naturais controladas ou nas IAs.

Os protocolos de IAs realizados neste experimento dependeram basicamente de exames citológicos seriados e dosagens séricas de progesterona. Como as cadelas pertenciam a proprietários, que na maioria das vezes, não conheciam o histórico reprodutivo anterior de suas fêmeas, no momento em que esses animais eram trazidos para o Hospital Veterinário, era realizado uma citologia vaginal e a partir dos resultados obtidos, o animal era internado e seguia-se com exames, de citologia vaginal e dosagem de progesterona sérica.

Quando a citologia vaginal apresentava 80% de células superficiais era realizada a dosagem de progesterona sérica. Quando os níveis de progesterona atingiam 10,00ng/mL ou valores próximos, a IA intra-uterina era realizada 72 horas após. No caso das IAs intravaginais, as inseminações eram realizadas após 48 horas e 96 horas.

Quando consideramos apenas as fêmeas inseminadas, por via intra-uterina, e que se tornaram prenhes, a média da concentração de progesterona foi de 22,22ng/mL (média do grupo foi de 19,30ng/mL) e a média na contagem de células superficiais foi 93% (média do grupo foi de 87,50%), Tabelas 13. Levando em consideração as particularidades reprodutivas da espécie objeto desse estudo como, luteinização precoce dos folículos pré-ovulatórios, ovulação de ovócitos primários, desenvolvimento final dos ovócitos nas tubas uterinas, o protocolo utilizado foi adequado para IA intra-uterina.

Quando analisamos os resultados individualmente, a cadela *Estrela*, do grupo 1, IA intra-uterina, a concentração de progesterona foi de 7,53ng/mL, muito inferior a

média apresentada pelas cadelas do mesmo grupo, mas que se tornaram gestantes. Neste caso, muito provavelmente a IA foi realizada muito cedo em relação à ovulação, muito embora, a qualidade da amostra de sêmen utilizada era inferior as amostras usadas nas cadelas gestantes. Segundo Lévy & Fontbonne (2007), a concentração de progesterona no momento da ovulação é praticamente constante e por volta de $6,25 \pm 1,55$ ng/mL; isso significa que no caso, dessa cadela, com progesterona de 7,53 ng/mL, a IA pode ter sido realizada no dia da ovulação e não 72 horas após como o protocolo utilizado nesse experimento.

Outra cadela desse mesmo grupo, *Neguinha*, apresentou progesterona de 19,35 ng/mL e citologia vaginal de 55% de células superficiais e permaneceu vazia. Mesmo com uma concentração de progesterona compatível com ovulação, a amostra de sêmen utilizado nesta cadela, apresentou qualidade inferior, principalmente no tocante a integridade de membranas (associação de sondas: classificação 1 = 0%, classificação 8 = 58%; CDFA/IP = 61%; e vivos = 48%). A citologia vaginal, embora com resultados abaixo do esperado para a fase de estro, não se constitui em um método eficiente para determinação da ovulação.

Em relação aos resultados obtidos no grupo de fêmeas inseminadas, por via intravaginal, a única cadela gestante, apresentou uma média de progesterona de 29,75 ng/mL (29,69 ng/mL e 29,80 ng/mL), citologia vaginal de 93% (100% e 86%); as demais fêmeas, desse grupo, apresentaram média de progesterona de 26,21 ng/mL com citologia vaginal de 86,16%, Tabelas 12.

Do grupo 2, IA intravaginal, 05 das 06 fêmeas permaneceram vazias, mesmo que monitoradas da mesma maneira que as cadelas do grupo 1; as 05 fêmeas vazias apresentaram progesterona compatível com ovulação ($\geq 10,00$ ng/mL) e citologia vaginal característica de estimulação estrogênica, com exceção da cadela *Ozama*. Da mesma forma, as amostras de sêmen utilizadas nesse grupo foram consideradas de qualidade, semelhantes às usadas nas fêmeas do grupo 1, que se tornaram prenhes. Isto posto, a provável justificativa para os resultados negativos desse grupo, que se deve a técnica de deposição do sêmen no interior do trato reprodutivo das fêmeas.

A longevidade da célula espermática dos cães, no trato genital das fêmeas, é uma característica da espécie e compensa de certa forma, as particularidades reprodutivas das fêmeas caninas. A maturação nuclear nas cadelas esta completa após 48 a 72 horas das ovulações, na presença de elevados níveis de progesterona (CONCANNON et al., 1989; REYNAUD et al., 2005), quando os ovócitos atingem a porção média das tubas uterinas.

O processo de congelação/descongelação do sêmen altera ou reduz drasticamente a sobrevivência espermática, diminuindo sua longevidade para apenas 24 horas após a descongelação. Este fato determina um sincronismo muito grande entre o período de fertilidade dos ovócitos e dos espermatozoides, necessitando de protocolos mais rigorosos para determinação do momento da IA com sêmen congelado.

No caso das IAs intravaginais, além da manutenção da qualidade seminal pós-descongelação, há necessidade de uma maior resistência e/ou longevidade do sêmen para alcançar o local de fertilização em condições de se ligar e penetrar a zona pelúcida.

A dificuldade de acessar o útero através da cérvix é um grande empecilho para obtenção de taxas de concepção satisfatórias com o uso de sêmen descongelado. A possibilidade de se introduzir o sêmen diretamente no corpo do útero facilitaria e viabilizaria a técnica de IA nos cães. O fato de a laparotomia ser um procedimento custoso e de risco, torna a técnica de IA pouco requisitada pelos proprietários e criadores, desestimulando até certo ponto a pesquisa nessa área. Hoje com possibilidade de usar equipamentos mais sofisticados, como os endoscópios rígidos acoplados a uma fonte de luz, o procedimento de IA intra-uterina pode se tornar uma técnica mais segura, menos invasiva, mais econômica, e com resultados satisfatórios (WILSON, 2003).

Além de resultados de taxas de concepção superiores da IA intra-uterina, tanto a concentração de sêmen, como o volume inseminante, podem ser inferiores quando comparada com a IA intravaginal. Isto é particularmente importante quando se

trabalha com sêmen pouco concentrado, com animais idosos, com animais portadores de doenças crônicas, mas detentores de características zootécnicas importantes.

O fato importante e que deve ser considerado nos procedimentos de IA é a concentração espermática por palheta. Nesse experimento, foi utilizada uma dose inseminante de aproximadamente $150/160 \times 10^6$ espermatozóides, ou seja, 4 palhetas, pois cada uma das palhetas continham 40×10^6 espermatozóides, o que resultou num volume inseminante de 2 mL. Em trabalhos futuros com IA intra-uterina, talvez fosse interessante aumentar a concentração espermática para 80 ou 100×10^6 espermatozóides por palheta, pois dessa forma, poder-se-ia trabalhar com um volume inseminante menor.

As taxas de gestação de IA intra-uterina verificadas nesse trabalho foi de 66,67%, resultados semelhantes foram obtidos por Farstad (1989) e Silva et al. (1996); superiores ao de Linde-Forsberg (2001); e inferiores a Fontbonne & Badinand (1993), Tsutsui et al. (2000), Linde-Forsberg (2001), e Kim et al. (2007).

Os resultados obtidos no grupo 1, IA intra-uterina, permitem sugerir que o protocolo utilizado, citologia vaginal seriada até a obtenção de 80% de células superficiais e a partir daí análises das concentrações de progesterona, se constitui num esquema de IA adequado.

A IA intravaginal, a despeito de ser uma técnica de execução mais fácil, menos custosa, apresenta resultados de taxas de concepção inferiores a técnica intra-uterina. Além da necessidade de se monitorar a fase de proestro e estro das cadelas, é preciso repetir o procedimento da IA, no mínimo duas vezes e a amostra do sêmen descongelado deve ser de ótima qualidade, e apresentar uma resistência e/ou longevidade para atingir o local de fertilização com capacidade de se ligar e penetrar os ovócitos.

A despeito de ter utilizado duas IAs intravaginal, e portanto, o dobro da dose inseminante, nossos resultados foram insatisfatórios; talvez uma maior concentração espermática em cada inseminação poderia resultar em maiores taxas de concepção. Outro aspecto a ser considerado seria o tempo de sobrevivência do sêmen utilizado, esse parâmetro poderia ser conseguido através de testes de termo resistência; talvez as

amostras de sêmen usadas apresentassem uma resistência muito baixa, a ponto das células não sobreviverem ou perderem sua capacidade fecundante antes de atingirem o local de fertilização.

A taxa de gestação da IA intravaginal evidenciada nessa pesquisa foi de 16,67%. Esse resultado foi inferior aos publicados por Fontbonne & Badinand (1993) – 52,6%, por Linde-Forsberg (1995) – 40 a 80%, e por de Linde-Forsberg (2001) – 34,6%; e superior a Tsutsui et al. (2000) que conseguiram 0%.

O sucesso da técnica de IA com sêmen congelado/descongelado nos cães depende de inúmeros fatores, entre eles, o acompanhamento rigoroso da fase folicular do ciclo estral das cadelas; dos diversos critérios descritos para a determinação do momento ideal da IA, a dosagem de progesterona é a mais indicada, havendo uma correspondência segura entre a ovulação e as concentrações de progesterona. Por outro lado, a qualidade do sêmen descongelado responde por uma grande parcela desse sucesso, havendo necessidade de se trabalhar com ejaculados que resistam bem ao procedimento de congelação. Só assim, com um controle e conhecimento da fisiologia reprodutiva das fêmeas associado à manipulação adequada e métodos de criopreservação de sêmen eficientes pode-se esperar bons resultados da IA com sêmen congelado na espécie canina.

CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que:

- 1) O sêmen submetido ao processo de congelação e descongelação proposto, e avaliado *in vitro* e *in vivo*, apresentou capacidade fecundante.
- 2) A taxa de gestação de fêmeas submetidas à técnica de IA intra-uterina, por laparotomia, foi superior a taxa de concepção de fêmeas submetidas à técnica de IA intravaginal.
- 3) A associação de sondas fluorescentes (IP, JC-1 E FITC-PSA) na espécie canina para avaliação da integridade das membranas espermáticas demonstrou ser eficiente e sensível.
- 4) O exame citológico e a dosagem de progesterona sérica podem ser utilizados para identificar o melhor momento de IA nas cadelas.

REFERÊNCIAS

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v.7, p.145-173, 1987.

AMANN, R.P. Cryopreservation of sperm. **Encycl. Reprod.**, v.1, p.773-783, 1999

ANDERSEN, K. Fertility of frozen dog semen. **Acta Vet. Scand.**, v.13, p.128-130, 1972.

ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. **Zuchtygiene**, v.10, p.1-4, 1975.

BATTISTA, M.; PARKS, J.; CONCANNON, P. Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, TRIS or test extenders. **Anim. Reprod. Sci.**, v.3, p.229-231, 1989.

CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco. **Rev. Ciênc. Rural**, v.32, n.4, p.657-661, 2002.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. **Anim. Reprod. Sci.**, v.92, p.384-391, 2006.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeito da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

CHALAH, T.; BRILLARD, J.P. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin/nigrosin and dual fluorescence (SYBR14-PI). **Theriogenology**, v.50, p.487-493, 1998.

CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F. F.; TEBET, J.M.; LOPES, M.D.; TRINCA, L.A. Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de congelação de sêmen de cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, n.3, p.361-363, 2003.

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

CONCANNON, P.W et al. Biology and Endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.39, p.3-25, 1989.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. (Ed). **Curr. Vet. Ther. X**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989. p.1247-1258.

CONCANNON, P.W.; VERSTEGEN, J. Some unique aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary practice. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 30., 2005, México.. **Proceedings...**, México, 2005, p.1-8.

CUNHA, I.C.N; LOPES, M.D. Efeito de três diferentes diluidores sobre o sêmen canino submetido a dois protocolos de descongelamento. **Braz. J. Vet Res Anim. Sci.**, v.42, n.5, p.372-380, 2005.

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

CUNHA, I.C.N; LOPES, M.D. Efeito de diferentes períodos de equilíbrio e meios diluidores sobre o sêmen canino congelado e descongelado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, p.470-471, 2001.

DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. The estimation of sperm motility in semen on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. **J. Reprod. Fert.**, v.55, p.161-166, 1979.

ENGLAND, G.C.W.; PLUMMER, J.M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.261-270, 1993.

ENGLAND, G.; CONCANNON, P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. **Ithaca: International Veterinary Information Service**, 2002. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 1 de fevereiro de 2008.

FARSTAD, W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. **J. Small. Anim. Pract.**, v.25, p.561-565, 1984.

FARSTAD, W.; BERG, K.A. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.39, p.289-292, 1989.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. 785p.

FELDMAN, E.C; NELSON, R.W. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: FELDMAN, E.C; NELSON, R.W. **Canine and Feline endocrinology and reproduction**. 2.ed. Philadelphia: W.B Saunders Company, 2004. p.78

FONTBONNE, A.; BADINAND, F. Studies on freezing dog spermatozoa. Effect of glycerol on motility after thawing. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.531-532, 1993.

FONTBONNE, A., MALANDAIN, E. Ovarian ultrasonography and follow-up of estrus in the bitch and queen. **Waltham Focus**, v.16, n.2, 2006. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 24 de março de 2008.

FOOTE, R.H. The effects of electrolytes, sugars, glycerol and catalase on survival of dog sperm in buffered yolk mediums. **Am. J. Vet. Res.**, 25, 37-39, 1964.

FOOTE, R.H.; LEONARD, E.P. The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. **Cornell Vet.**, v.54, p.78-89, 1964.

GIER, J. Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch. **Theriogenology**, v. 66, n.6-7, p.141-1422, 2006.

GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Ann. Mathem. Stat.**, v.35, n.2, p.716-725, 1964.

GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Technometrics**, v.7, n.2, p.247-254, 1965.

GÜNZEL-APEL, A.R.; GÜNTHER, C.; TERHAER, P.; BADER, H. Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. **J.Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.271-278, 1993.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.**, v.11, p.73-88, 1990.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to asses membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p.343-352, 1990.

HARROP, A.E. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. **Vet. Rec.**, v.110, p.194-196, 1954.

HAY, M. A.; KING, W.A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Effects of cooling, freezing, and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.51, p.99-108, 1997.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.3-22, 2000.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. Validation of sperm quality analyser (SQA) for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.1143-1158, 2001.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OSLON, P.N.S. Vaginal Cytology. In: _____. **Canine feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. cap.3, p.32-40.

KIM, H.J.; OH, H.J.; JANG, G.; KIM, M.K. Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-thawed canine semen. **J. Vet. Sci.**, v.8, n.1, p.75-80, 2007.

KUSTRITZ, R. Use of commercial luteinizing hormone and progesterone assay kits in canine breeding management. **Ithaca: International Veterinary Information Service**, 2001. Disponível em: <www.ivis.org.>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2008.

LÉVY, X.; FONTBONNE, A. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, n.1, p.128-134, 2007.

LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.39, p.299-310, 1989.

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. **Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Prac.**, 21, 467-486, 1991.

LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. **J.Reprod. Fert. Suppl.**, v.43, p.313-323, 1993.

LINDE-FORSBERG, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Vet. Med. Surg. (Small Animal)*, v.10, p.48-58, 1995.

LINDE-FORSBERG, C.; STROM HOLST, B.; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. **Theriogenology**, v.52, p.11-23, 1999.

LINDE-FORSBERG, C. Fertility data from 2041 controlled artificial insemination in dogs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 4, 2000, Oslo. **Proceeding...Oslo**, 2000. p.120.

LINDE-FORSBERG, C. Intra-uterine insemination in the dog using scandinavian transcervical catheter and a comparison with other methods. **Ithaca: International**

Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: <www.ivis.org.>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2007.

LOFSTEDT, R. Applied reproductive physiology of bitches. Section A; The bitch. In: LOFSTEDT, R. **A manual for theriogenology**. 2004. p. 3-8.

LUVONI, G.C et al. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. **Reprod. domest. anim.**, v.41, p. 286-290, 2006.

MARSELOO, N.; FONTBONNE, A.; BASSU, G.; RIVIERE, S.; LEBLANC, B.; RAULT, D.; BOURGE, V.; CHASTANT-MAILLARD, S. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. In: 5., INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 2004, Embu das Artes. **Abstracts Book...**São Paulo, 2004. p.75-77.

MARTINS, M.I.M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. 2005. 120f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu.

MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; SARATSIS, P.; BOSCO, C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.68, p.204-212, 2007.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial, inseminação artificial nos cães**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 750p.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. *In vitro* evaluation of sperm quality. **Anim. Reprod. Sci.**, v.105, n.1, p.104-118, 2008.

NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. **Biostatistics – The bare essentials**. More Year Book St. Louis, 1994, 270p.

NÖTHLING, J.O.; VOLKMANN, D.H. Effects of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.47, p.335-341, 1993.

NÖTHLING, J.O.; VOLKMANN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v.66, p.49-55, 1995.

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

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; BICUDO, S.D.; LOPES, M.D.; RAMIRES, P.R.N. Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Sthynnodendrum barbatiman*). In: CONGRESSO DE BIOLOGIA CELULAR, 5., 1986, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1986. p.86.

PENA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-174, 1998a.

PENA, A.I.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. **Theriogenology**, 50, 1211-1120, 1998b.

PENA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of equex one or two dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-875, 2000.

PENA, A.I.; LOPEZ-LUGILDE, L.; BARRIO, M.; BECERA, J.J.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Studies on the intracellular Ca²⁺ concentration of frozen-thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. **Reprod. Domest. Anim.**, v.38, p.27-35, 2003.

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

PLATZ, C.C.; SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Lab. Anim. Sci.**, v.27, p.1013-1016, 1977.

REYNAUD, K et al. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, v.130, p.193-201, 2005.

RIGAU, T.; CAMPRUBI, M.; BADIA, J.; BALLESTER, J.; JESUS PALOMO, M.; RIVERA, M.; IZQUIERDO, D.; PEÑA, A.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. Different effects of glucose and fructose on energy metabolism in dog sperm from fresh ejaculates. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, **Proceedings...** Stockholm: European Society for Study of Reproduction, 2000. p. 24.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1669-1681, 2002.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, v.60, p.1553-1568, 2003.

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

RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado.** 1997. 176f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EKWALL, H.; LINDE-FORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen spermatozoa. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.279-285, 1993.

ROMAGNOLI, S. Canine artificial insemination with fresh, refrigerated and frozen semen. In: Veterinary Sciences Congress, Oeiras. **Proceedings...** 2002. p. 167-170.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1997.

ROTA, A. **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa.** 1998, p.1-42. Thesis (Doctoral) - Uppsala Sweden: SLU Service/Reprod.

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

ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. **Theriogenology**, v.51, n.6, p.1045-1058, 1999.

SANCHEZ, A.; RUBILAR, J.; GATICA, R. Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. **Arch. Med. Vet.**, v.34, n.1, p.131-134, 2002.

SANTOS, I.W. **Albumina sérica bovina como fonte protéica do diluidor Tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino.** 2004. 63f. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SCHÄFER-SOMI, S.; AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. **Anim. Reprod. Sci.**, v.102, p.1-13, 2007.

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

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

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

SILVA, A.R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, n.1, p.119-127, 2007.

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

SILVA, L.D.M. **Procréation médicalement assistée dans l'espèce canine. Investigations morpho-fonctionnelles et optimisation dès techniques permettant d'arriver à la maîtrise de la reproduction.** 1995. 173f. Tese (doutorado) Université de Liège, Liège.

SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B.; VERSTEGEM, J.P. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Vet. Rec.**, v.138, p.154-157, 1996.

SOUZA, F.F.; BARRETO, C.S.; LOPES, M.D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. **Theriogenology**, v.68, p.100-106, 2007.

SRIKANDAKUMAR, A.; INGRAHAM, R.H.; ELLSWORTH, M.; ARCHBALD, L.F.; LIAO A.; GODKE, R.A. Comparison of a solid-phase, no extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare bitch and cow. **Theriogenology**, v.26, p.779-793, 1986.

STORNELLI, M.A.; STORNELLI, M.C.; ARAUZ, M.S.; DE LA SOTA, L. Inseminación artificial com semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. **Analecta Veterinaria**, v.21, n.1, p.58-66, 2001.

STRÖM, B; ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p.247-256, 1997.

THOMAS, P.G.A.; SURMAN, V.; MYERS-WALLEN, V.N.; CONCANNON, P.W.; BALL, B.A. Addition of sodium dodecyl sulphate to the TRIS-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992. **Proceeding...** 1992. v.4, p.1825.

THOMAS, P.G.A.; LARSEN, R.E.; BURNS, J.M.; HAHN, C.N. A comparison of three packing techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v.40, p.1199-1205, 1993.

THOMASSEN, R.; FARSTAD, W.; KROGENAES Artificial insemination with frozen semen in the dog: a retrospective study. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.57, p.341-346, 2001.

TSUTSUI, T.; HASE, M.; TANAKA, A.; FUJIMURA, N.; HORI, T.; KAWAKAMI, E. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of Orvus ES Paste-Supplemented egg yolk Tris-fructose citrate. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.603-606, 2000.

WEISS, R.R.; RODASKI, S.; BÜCHEL, J.M.; SANTOS, I.W; ALMEIDA, L.M. Estudo preliminar de algumas características do sêmen canino congelado. **Arch. Vet. Sci.**, v.5, p.67-71, 2000.

WILSON, M. Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **J. Reprod. Fertil.**, v.47, p.307-311, 1993.

WILSON, M.S. Endoscopic transcervical insemination in the bitch. **Ithaca: International Veterinary Information Service**, 2001. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 12 de dezembro de 2007.

YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. **Cryobiology**, v.44, p.62-78, 2002.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis, **4. ed.** New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.

ANEXO 1

Valores do “setup” estabelecido para avaliação do sêmen de cão no sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer, HTR-IVOS 10 Analyzer, Hamilthon Thorne Research, Beverly, MA, USA).

VARIÁVEL		VALOR
Frames por segundo		60 Hz
Número de frames		50
Contraste mínimo		40
Mínimo tamanho celular		4 pixel
Default	Tamanho celular	5 pixel
	Intensidade celular	45
Células progressivas	VAP	60 $\mu\text{m/s}$
	STR	70%
Células lentas	VAP – Cutoff	30 $\mu\text{m/s}$
	VSL – Cutoff	20 $\mu\text{m/s}$

ANEXO 2

Preparo das soluções das sondas fluorescentes de Diacetato de 6- carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio.

Solução Estoque de Diacetato de 6- carboxifluoresceína	
Diacetato de 6- carboxifluoresceína	9,2 mg
DMSO	20 mL

Solução Estoque de Iodeto de Propídio (P-4170, SIGMA)	
Iodeto de Propídio	10 mg
Solução Fisiológica	20 mL

Solução de Formaldeído	
Formalina	1:80
Solução Fisiológica	40%

Solução de Citrato de Sódio a 3%	
Citrato de Sódio	3,0 g
Solução Fisiológica	100 mL

ANEXO 3

Preparo das soluções de estoque e trabalho da associação de sondas fluorescentes FITC-PSA, IP e JC-1.

FITC-PSA (L-0770, SIGMA)

Diluição 1 – Solução de Azida de Na	
Azida de Na	200 mg
PBS	20 mL

Diluição 2 – Solução Trabalho (100µg/mL)	
Solução de Azida de Na	20 mL
FITC-PSA	2 mg

Estocar em geladeira

Iodeto de Propídio (P-4170, SIGMA)

Solução Trabalho (500µg/mL)	
Iodeto de Propídio	5 mg
PBS	10 mL

Estocar em freezer

JC-1 (T3168, Molecular Probes)

Diluição 1 - Solução Estoque (7650 µM)	
JC-1	5 mg
DMSO	1 mL

Diluição 2 - Solução Trabalho (76,5 µM)	
Solução Estoque	50 µL
DMSO	4950 µL

Estocar no freezer

ANEXO 4

Preparação do meio diluente TRIS/OEP/Frutose/8%Glicerol utilizado no processo de congelamento do sêmen canino.

TRIS	2,4 g
Ácido Cítrico	1,4 g
Frutose	0,8 g
OEP	1 mL
Sulfato de Amicacina	0,02 g
Glicerol	8 mL
Gema de Ovo	20 mL
Água Destilada	Completar para 100 mL

pH = \pm 6,8

Osmolaridade = \pm 300 mOsmol