

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E ULTRASSONOGRÁFICA
DE TESTÍCULOS E PRÓSTATAS
DE CÃES (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758) DA RAÇA
BEAGLE, ALIMENTADOS COM TRÊS RAÇÕES
COMERCIAIS DE QUALIDADES DIFERENTES.**

Valeska Rodrigues

Médica Veterinária

JABOTICABAL-SP- BRASIL

Dezembro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E ULTRASSONOGRÁFICA
DE TESTÍCULOS E PRÓSTATAS
DE CÃES (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758) DA RAÇA
BEAGLE, ALIMENTADOS COM TRÊS RAÇÕES
COMERCIAIS DE QUALIDADES DIFERENTES.**

VALESKA RODRIGUES

Orientador: PROF. DR. GILSON HÉLIO TONIOLLO

Tese apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL-SP

2009

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

VALESKA RODRIGUES- nascida aos 10 dias do mês de março de 1979, na cidade de Guarulhos, SP. Coursou o primeiro e segundo grau em escola pública, sendo aprovada no vestibular para o curso de Medicina Veterinária, em fevereiro de 1999. Obteve a graduação de médica veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP- Câmpus de Jaboticabal, em dezembro de 2003, sendo a 5ª colocada na classificação geral da turma de formandos do curso, além de obter a nota máxima de sua Instituição, no Exame Nacional de Cursos do MEC, realizado em 2003. Obteve o título de Mestre em Cirurgia Veterinária, em julho de 2006, sob orientação do prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP- Câmpus de Jaboticabal

"Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar"

Chico Xavier

Dedicatória

A minha mãe Josefa Moreira Rodrigues que sempre me apoiou e defendeu.

Ao meu pai André Luiz Rodrigues (in memoriam), que lutou muito, mas infelizmente não pode estar presente na finalização dessa tese. Mas em espírito tenho certeza que ainda me acompanha.

Aos meus irmãos Anadege Rodrigues, André Luiz Rodrigues Junior e Sarah Cristina Rodrigues, por me acompanharem de longe, mas torcendo para que tudo desse certo.

Ao meu amor André Luís Borges, que apesar de muitos obstáculos, está presente novamente em minha vida.

Ao professor e orientador Gilson Hélio Toniollo, que me guiou ao longo desses anos e hoje conseguimos mais essa vitória.

Aos meus bichos de estimação: Fire, Sophie, Juninho e Winny, os quais muitas vezes foram deixados de lado para que eu pudesse realizar esse trabalho.

Dedico

Agradecimentos

A **Deus** por ter me dado garra e coragem para enfrentar obstáculos na vida e vencê-los.

A **FAPESP** pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho teria mais dificuldades em ser desenvolvido.

Ao professor **Aulus Cavalieri Carciofi**, mentor deste trabalho, assim como aos pós graduandos, residentes e funcionários do laboratório de nutrição envolvidos no projeto, por todo apoio. Agradeço também as empresas conveniadas ao Laboratório de pesquisa em Nutrição e doenças nutricionais de cães e gatos, do Departamento de Clínica e Cirurgia da FCAV UNESP/Jaboticabal pelo apoio, em especial a **Guabi** que é um dos grandes parceiros atualmente.

A professora **Maria Denise Lopes, Fabiana Ferreira de Souza** e professor **Frederico Ozanam Papa**, pelos ensinamentos passados, muito importantes para a realização desse trabalho. O agradecimento estende-se a todos do departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ UNESP/Botucatu.

Aos professores **Francisco Guilherme Leite** e **Paulo Henrique Franceschini**, pela grande ajuda, assim como a todos o departamento de Reprodução Animal da FCAV UNESP/Jaboticabal.

Aos amigos de profissão: **Diogo José Cardilli, Carolina Franchi João, Fabiana Azevedo Voorwald, Caio de Faria Tiosso, Lizandra Amoroso, Ana Gabriela Valério, Denise Claudia Tavares, Michele Garcia Medeiros, João Humberto Teotônio de Castro, Juliana Borges, Patrícia Rotta Lopes, Leandro Luis Martins, Rogério Vieira da Silva, Viviane Helena Chirinéa, Luciana Paes Macedo, Marco Augusto Machado da Silva, Kellen de Sousa Oliveira** pela amizade e ajuda durante essa jornada.

As amigas **Elzylene Léga, Mildre Loraine** Pinto por participarem de momentos bons e ruins com amizade e compreensão. Agradeço a amizade de todos os funcionários da clínica veterinária Bichos e Caprichos Jaboticabal/SP.

Ao professor **Jeffrey Frederico Lui** e família pela grande ajuda a comunidade, com seus trabalhos humanitários e em saúde animal.

Aos meus **tios, primos, avó**, pelo apoio e incentivo.

Aos amigos distantes **Davidson Valsirolli, Georgedson Valsirolli, Eduardo, Sandra F. Sales, Emerson Fernandes, Érica Noronha e Alexandre Monteiro, Danilo Gama Martins** pelo apoio e perdão pela distância física (não afetiva) que nos separou.

Ao **Prof. Dr. João Ademir de Oliveira**, pela valiosa colaboração nas análises estatísticas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

Sumário

Lista de abreviaturas	ii
Lista de tabelas	iv
Lista de figuras	vi
Resumo.....	viii
Abstract	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 Avaliação e congelação do sêmen.....	2
2.1.1- Histórico.....	2
2.1.2 Avaliação da qualidade do sêmen	2
2.1.3 Congelamento de sêmen	7
2.2 Análise ultrassonográfica	8
2.3 Nutrição	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Composição do grupo experimental	10
3.2 Colheita do sêmen	11
3.3 Análise do ejaculado	11
3.3.1 Análises microscópicas.....	11
3.4 Criopreservação do sêmen	12
3.4.1-Avaliação do sêmen criopreservado.....	13
3.5 Mensuração e avaliação ultrassonográfica de testículos e próstata	13
3.6 Análise estatística.....	13
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS	39

Lista de abreviaturas

- **ABNT:** Associação Brasileira de Normas Técnicas
- **ALT:** Alanina aminotransferase
- **BAS:** leucócitos basófilos
- **Caract.:** característico
- **CASA:** Computer assisted semen analyser
- **cel:** células
- **cm:** centímetro
- **dL:** decilitro
- **EOS:** leucócitos eosinófilos
- **FA:** fosfatase alcalina
- **FSH:** hormônio folículo estimulante
- **g:** grama
- **GnRH:** hormônio liberador de gonadotrofinas
- **h:** horas
- **Hb:** hemoglobina
- **He:** hemácias
- **Ht:** hematócrito
- **IA:** Inseminação artificial
- **LANA:** Laboratório de nutrição animal
- **LEU:** leucócitos
- **LH:** hormônio luteinizante
- **LINF:** leucócitos linfócitos
- **mg:** miligrama
- **mL:** mililitro
- **MON:** leucócitos monócitos
- **mov:** movimento
- **NB:** leucócitos neutrófilos bastonetes
- **NS:** leucócitos neutrófilos segmentados

- **PT:** proteína total
- **ROS:** espécies reativas de oxigênio
- **sptz:** espermatozóides
- **TRIS:** hidroximetil amino metano
- **µg:** micrograma
- **µL:** microlitro

Lista de tabelas

Tabela 1- Níveis de garantia dos produtos fornecidos aos animais durante o estudo, A (Econômica), B (Premium) e C (Super premium) e análise química, Jaboticabal/SP, 2009.	16
Tabela 2- Parâmetros médios do sêmen de cães da raça Beagle, alimentados com três rações comerciais (A: Econômica, B: <i>Premium</i> , C: <i>Super Premium</i>), Jaboticabal/SP, 2009.	18
Tabela 3- Médias e desvios padrão de motilidade espermática (%), vigor(0-10), concentração (espermatozóides $\times 10^6$ /mL), espermatozóides totais no ejaculado ($\times 10^6$) e defeitos na morfologia espermática (%), de cães da raça Beagle, tratados com três rações comerciais, Jaboticabal/SP, 2009.	26
Tabela 4- Principais parâmetros do sêmen canino, pós-descongelação, de cães da raça Beagle, tratados com três diferentes rações comerciais (A: Econômica, B: <i>Premium</i> , C: <i>Super Premium</i>), Jaboticabal/SP, 2009.....	28
Tabela 5- Médias e desvios padrão de motilidade espermática (%), movimento progressivo (%) e defeitos na morfologia espermática (%), do sêmen pós-descongelação, de cães da raça Beagle, alimentados com três rações comerciais (A: Econômica, B: <i>Premium</i> , C: <i>Super Premium</i>), Jaboticabal/SP, 2009.....	29
Tabela 6- Medidas do testículo direito (D) e esquerdo (E) de cães da raça Beagle, obtidas com paquímetro, alimentados com três rações comerciais (A: Econômica, B: <i>Premium</i> , C: <i>Super Premium</i>), Jaboticabal/SP, 2009.	29

Tabela 7- Biometria de próstata dos cães da raça Beagle, tratados com três rações comerciais diferentes (A: Econômica, B: <i>Premium</i> , C: <i>Super Premium</i>), obtidas por exame ultrassonográfico, Jaboticabal/SP, 2009.	30
Tabela 8- Análise Hematológica média dos animais, dentro de cada grupo experimental, Jaboticabal/SP, 2009.	48
Tabela 9- Análise dos parâmetros bioquímicos médios, dentro de cada grupo experimental, Jaboticabal/SP, 2009.	48
Tabela 10- Análise média da urina dos animais, dentro de cada grupo experimental, Jaboticabal/SP, 2009.	49
Tabela 11- Idade dos cães da raça Beagle que compuseram o grupo experimental, Jaboticabal/SP, 2009.	49
Tabela 12- Componentes do diluente para o sêmen canino elaborado por ROTA et al. (1997) - ROTA A., STRÖM B., LINDE-FORSBERG C., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. Theriogenology 1997; 47: 1093-1101.	50

Lista de figuras

- Figura 1- Imagem fotográfica da colheita de sêmen de cão da raça Beagle, pela técnica da manipulação digital, com auxílio de tubo coletor cônico adaptado a um funil.16
- Figura 2- Representação gráfica das médias de motilidade espermática ($\times 10^{-2}\%$) do sêmen de cães da raça Beagle (1 a 8), durante o período de tratamento com três rações comerciais (A: Econômica, B: *Premium* e C: *Super Premium*).20
- Figura 3- Representação gráfica do vigor espermático (notas de 0 a 10) do sêmen de cães da raça Beagle (1 a 8), durante o período de tratamento com três rações comerciais(A: Econômica, B: *Premium* e C: *Super Premium*).21
- Figura 4- Representação gráfica das médias de concentração espermática (n° de espermatozóides $\times 10^6/\text{mL}$) do sêmen de cães da raça Beagle (1 a 8), durante o período de tratamento com três rações comerciais(A: Econômica, B: *Premium* e C: *Super Premium*).22
- Figura 5- Representação gráfica das médias de defeitos espermáticos totais ($\times 10^{-2} \%$) do sêmen de cães da raça Beagle (1 a 8), durante o período de tratamento com três rações comerciais(A: Econômica, B: *Premium* e C: *Super Premium*).23
- Figura 6- Representação gráfica das médias de defeitos espermáticos secundários ($\times 10^{-2} \%$) do sêmen de cães da raça Beagle (1 a 8), durante o período de tratamento com três rações comerciais(A: Econômica, B: *Premium* e C: *Super Premium*).24

- Figura 7- Fotomicrografia das lâminas de sêmen canino coradas pelo método de Karras modificado, ao exame microscópico de luz (Objetiva de 100X, sob imersão em óleo). Em A, a seta indica o defeito espermático de microcefalia. Em B, a seta indica destacamento de acrossomo em espermatozóide com deformidade de cabeça (diminuída). Em C, espermatozóides normais. Em D, seta preta indica defeito de acrossomo, e a vermelha indica gota citoplasmática proximal. Em E, a seta preta indica cauda fortemente enrolada e a vermelha, destacamento de acrossomo. Em F, as setas indicam caudas fortemente enroladas com gota.....25
- Figura 8- Imagem fotográfica do botijão criogênico contendo N₂ líquido, para estoque das amostras de sêmen congelado.....27
- Figura 9- Imagem fotográfica do aparelho Hamilton Thorn (HTR analyser, Hamilton Thorn Research, Berverly, EUA), durante análise computadorizada do sêmen canino, pós descongelação.27
- Figura 10- Imagem fotográfica do exame ultrassonográfico de próstata (A) e testículo (B), de cães da raça Beagle, tratado com três rações comerciais diferentes. Em A, a seta amarela indica o corte transversal da uretra prostática. Em B, as setas pretas indicam o *mediastinum testis*.31

Avaliação andrológica e ultrassonográfica de testículos e próstatas de cães (*Canis familiaris* – Linnaeus, 1758) da raça Beagle, alimentados com três rações comerciais de qualidades diferentes

Resumo

O crescimento acelerado na produção de alimentos para cães e gatos nem sempre é acompanhado pelo aumento de sua qualidade. Os desequilíbrios alimentares são diretamente responsáveis ou predispoem a inúmeras doenças ósseas, metabólicas e podem ser potenciais causadores de alterações testiculares, com reflexo na fertilidade de cães. Mediante isso, objetivou-se: avaliar as possíveis alterações de testículos e da próstata, por meio de exame ultrassonográfico, de cães alimentados com três diferentes dietas, analisar a qualidade do sêmen fresco e congelado ao longo dos tratamentos; verificar possíveis correlações entre rações fornecidas e variáveis reprodutivas analisadas. Oito cães da raça Beagle, adultos, foram selecionados e condicionados a colheita de sêmen. Três grupos de cães receberam rações comerciais distintas, a cada cinco meses. Transcorrido esse período, as rações foram trocadas de modo que, ao final de 15 meses, todos os grupos receberam três dietas diferentes. A cada 15 dias, o sêmen foi colhido e avaliado e, a cada troca de ração, foram realizadas avaliações ultrassonográficas de próstata e testículos, além da congelação do sêmen. As médias das variáveis, em cada grupo, nos três períodos, foram analisadas por meio de comparação emparelhada (teste t). Não existiu diferença ($p>0,05$) das análises andrológicas frente as rações utilizadas, de modo que os tipos de rações utilizadas não interferiram positiva ou negativamente na qualidade seminal dos animais tratados.

Palavras chave: cães, avaliação andrológica, nutrição

Andrological evaluation of Beagle canine semen and ultrasonography of testis and prostate, fed with three commercial foods

Abstract: The accelerate raise of the production of food for pets worldwide sometimes do not lead to increased food quality. Alimentary imbalances may be directly associated to several bone and metabolic diseases. Testicular degeneration and infertility may also be observed. Regarding the influence of the nutritional imbalance on the reproductive performance, the aim of the present study was: evaluate the quality of canine fresh semen and testis an prostate by means ultrasonography treated with three different types of commercial food for dogs. Eight adult Beagles were selected and conditioned to semen sampling. Three groups of dogs received three different types of dog food, every five-month intervals. After this period, the kind of dog food was changed. In the end of 15 months, all dogs were fed with all the types of dog food. Semen samples were obtained every 15-days interval and semen analysis were performed. The mean values of the variables were evaluated in the three periods by means of the t test. There was no significant difference ($p>0,05$) regarding the semen analysis among the different types of dog food. The types of dog food did not influence the quality of the semen of the animals in the present study during each experimental period.

Key words: dog, andrological evaluation, nutrition

1. INTRODUÇÃO

A domesticação do cão e sua manutenção como animal de estimação resultou, num processo de seleção gradativo e contínuo. Achados arqueológicos indicam que o cão doméstico existe há pelo menos 14 mil anos e que, sua domesticação ocorreu inicialmente na Europa e Ásia Ocidental, muito antes das outras espécies animais (JOHNSTON, 2000; WILLS & ROBINSON, 2000). A valorização desse processo ajudou a definir diferentes padrões raciais hoje conhecidos (RODRIGUES, 1997). Para isso, o homem vem tentando promover o melhoramento genético na criação de cães, usando inúmeras técnicas, dentre as quais pode-se destacar as biotécnicas reprodutivas. Com a aquisição do conhecimento do homem sobre os fenômenos da natureza, à partir do século XVIII na Europa, iniciou-se a aplicação de biotécnicas na reprodução dos cães e o desenvolvimento de novas raças (WILLS & ROBSON, 2000).

Dentre as biotécnicas, a que vem oferecendo maiores subsídios para a difusão do material genético na criação de cães, é a inseminação artificial, associada intimamente com a tecnologia de sêmen (SILVA, 2001). A utilização do sêmen canino, refrigerado ou criopreservado, permite a troca de material genético de alto valor zootécnico em localidades distantes, bem como o armazenamento desse material por períodos indefinidos (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989). Tendo em vista a influência da nutrição na função reprodutiva nas diferentes espécies e, a valorização das criações de animais de companhia, especificamente dos cães da raça Beagle, objetivou-se com este estudo:

- 1- Identificar possível variação na qualidade do sêmen, de acordo com o tipo de ração (*Econômica: A, Premium: B e Super Premium: C*), oferecida.
- 2- Identificar possível variação no tamanho e ecogenicidade testicular e prostática ao exame ultrassonográfico, conforme a dieta
- 3- Avaliar a qualidade do sêmen após o processo de criopreservação e correlacionar com os tratamentos alimentares efetuados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Avaliação e congelação do sêmen

2.1.1- Histórico

Os primeiros estudos relacionados à inseminação artificial e conservação do sêmen, na espécie canina, foram realizados por Lázaro Spallanzani no final do século XVIII (ENGLAND, 1993). Porém, esses estudos ficaram estagnados por longo período, devido maior interesse em animais de produção, como ruminantes e suínos. Somente em 1954, ROWSON conseguiu notificar a primeira congelação de sêmen canino com sucesso e, em 1969, SEAGER retomou os estudos e obteve a primeira gestação em cadela, utilizando sêmen criopreservado. Inúmeros estudos em reprodução de cães têm sido realizados, principalmente nas últimas duas décadas. O interesse nessa espécie cresceu e os criadores vêm requisitando mais serviços especializados, direcionados a animais de alto valor zootécnico ou afetivo. No Brasil, a primeira notificação de sucesso em inseminação artificial (IA), com sêmen canino congelado, foi realizada há pouco mais de duas décadas, com obtenção de seis filhotes saudáveis da raça Boxer (VASKE et al., 1981). Desde então, inúmeros trabalhos vem sendo realizados a respeito do processamento de sêmen canino. Recentemente, SANTOS (2004) apresentou resultados de 70% de nascimento após inseminação artificial com sêmen congelado diluído em meio a base de TRIS (hidroximetil amino metano).

Existem várias técnicas para congelação de sêmen nas diferentes espécies. No cão, pode-se utilizar diluidores à base de água de coco (ACP-106®) (CARDOSO et al., 2007), porém o TRIS é utilizado com maior frequência, com bons resultados.

2.1.2 Avaliação da qualidade do sêmen

A avaliação da qualidade do sêmen compreende as características físico-químicas, macro e microscópicas. Para colheita do ejaculado canino podem ser utilizados dois métodos. O primeiro consiste na massagem do pênis (estimulação

digital), que foi o empregado por Spallanzani em suas experiências e continua sendo preferido por alguns autores que afirmam obter sêmen de melhor qualidade. O segundo método é o que utiliza a vagina artificial. Para um bom êxito no trabalho, é indispensável um período de adaptação do animal, condicionando-o ao procedimento. Algumas vezes, faz-se necessária a presença de uma fêmea em estro ou secreção vaginal obtida por suabe, para que o macho possa cheirá-lo, e assim excitar-se (FELDMAN & NELSON, 1996).

O ejaculado canino é dividido em três frações diferenciadas. A primeira é a fração pré-espermática, de origem prostática, que possui aspecto aquoso e transparente, com volume variando de 0,5 a 5 mL. A segunda fração é rica em espermatozóides, com coloração variando de branco leitoso a translúcido, dependendo da concentração de células, e o volume varia entre 1 a 4 mL (JOHNSTON et al., 2001). A terceira fração é também de origem prostática, com aspecto aquoso e transparente e volume entre 2,5 a 80 mL, com função de facilitar o transporte espermático pela cervix e aumentar o volume do ejaculado (ENGLAND & ALLEN, 1992).

O número total de espermatozóides num ejaculado canino varia de 300 milhões a 2 bilhões, dependendo da raça, idade e frequência de colheita (JOHNSTON et al., 2001).

2.1.2.1 Avaliação de motilidade e vigor espermáticos

Segundo DERIVAUX (1980), a avaliação da motilidade espermática é definida com o percentual de espermatozóides móveis em uma amostra de sêmen e o vigor é a intensidade de seu movimento. Apesar da relação desse parâmetro com a capacidade fecundante do espermatozóide canino não estar totalmente elucidada, atualmente, a maioria dos pesquisadores ainda utiliza a motilidade como principal parâmetro para a avaliação de diluentes, crioprotetores e técnicas de criopreservação do sêmen canino (IVANOVA-KICHEVA et al., 1997; SILVA et al., 2003).

A avaliação da motilidade espermática deve ser realizada imediatamente após a colheita ou descongelação do sêmen, com auxílio de microscopia óptica de luz (SEAGER & FLETCHER, 1972), em microscópio de contraste de fase ou em analisador computadorizado (HTR-IVOS ANALYSER, Hamilton Thorn Research). A vantagem do analisador está na avaliação da característica do movimento espermático, se progressivo, retrógrado, velocidade espermática, velocidade em linha reta, curvilínea e linearidade dos espermatozóides (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

Deve-se avaliar o vigor espermático, que é a intensidade da motilidade exibida pelos espermatozóides móveis. Para isso, utilizam-se classificações que variam conforme o autor, com escalas que vão de 0 a 10 (PLATZ & SEAGER, 1977).

Apesar da grande utilização, a motilidade não é um parâmetro totalmente confiável para predizer a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen. A presença de espermatozóides imóveis na amostra não implica que estejam mortos. Em outras espécies, já foi comprovada a presença de espermatozóides estruturalmente intactos, porém imóveis após descongelação (JANUSKAUSKAS et al., 1995), que podem voltar a apresentar movimento, pela adição de substâncias estimulantes como a cafeína (LARSSON e EINARSSON, 1976). Por outro lado, espermatozóides que apresentem uma motilidade de boa qualidade, após descongelação, podem ser incapazes de fertilizar um oócito caso apresentem danos acrossomais (STROM et al., 1997). Assim, apesar da motilidade não ser um parâmetro indicativo de mensuração de espermatozóides vivos ou mortos, fornece informação de um fator necessário para a capacidade fertilizante do espermatozóide, pois a motilidade é a manifestação de sua competência estrutural e funcional (PEÑA-MARTINEZ, 2004).

Além disso, por ser uma avaliação subjetiva, a motilidade sofre influências como, por exemplo, da temperatura do local onde está sendo realizada e habilidade do avaliador, levando a elevada variabilidade entre laboratórios (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

2.1.2.2 Avaliação da morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática é um outro parâmetro importante. No entanto, até o momento, não foi descrita evidência de relação entre morfologia espermática e fertilidade no cão. Há poucos trabalhos que descrevem uma possível relação, porém com resultados conflitantes (OETTLÉ & SOLEY, 1985; RENTON et al., 1986; PLUMMER et al., 1987). OETTLÉ (1993) relatou que, a medida que o percentual de espermatozóides anormais aumenta, a fertilidade é reduzida, sendo observado que quando a proporção de espermatozóides morfológicamente normais está abaixo de 60%, a fertilidade é adversamente afetada.

Diversas classificações foram propostas para a morfologia espermática. SEAGER (1986) sugere a classificação das alterações morfológicas espermáticas como: primárias, quando relacionadas a problemas oriundos da produção espermática no testículo; secundárias, quando relacionados aos problemas causados durante a maturação espermática no epidídimo, ou oriundas dos processos de manipulação do sêmen, como diluição, resfriamento, congelação ou descongelação. OETTLÉ (1993) sugere a classificação de acordo com os danos que as alterações causam à função espermática, nomeando tais alterações como defeitos maiores ou menores. Já outros autores classificam as alterações de acordo com a região espermática afetada, sendo defeitos de cabeça, peça intermediária ou cauda (SILVA et al., 2003).

Segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do CBRA- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), a proporção de defeitos maiores e menores no sêmen de cão deve ser no máximo de 20%, não devendo o total de defeitos maiores ser superior a 10%.

Para possibilitar a avaliação da morfologia espermática, pode-se fazer uso de diversos corantes, tais como Eosina-Nigrosina (DOTT & FOSTER, 1972), Spermac® (OETTLÉ, 1993), Rosa Bengala (RODRIGUES, 1997), Giemsa (CARDOSO et al., 2003), Hematoxilina-Eosina (SILVA et al., 2003) Karras modificado por PAPA et al. (1988). Entretanto, é necessário enfatizar que nem todas as alterações acrossomais podem ser identificadas pela microscopia comum

(RODRIGUES, 1997), sendo sugerido o emprego de outras técnicas mais eficientes, como a microscopia eletrônica (SILVA, 2005).

A integridade de membrana espermática não só é importante para o metabolismo espermático, como também para o sucesso da fertilização do oócito. Para a avaliação dessa integridade podem ser utilizadas sondas fluorescentes (técnica descrita por HARRISON & VICKERS, 1990 e modificada por CUNHA et al., 1996, para utilização em cães). Esse tipo de técnica é capaz de avaliar a presença de rupturas na membrana espermática como resultado de lesão celular. As colorações fluorescentes permitem a avaliação espermática tanto pela microscopia de fluorescência, quanto pela citometria de fluxo.

2.1.2.3 Análise computadorizada

A análise computadorizada (CASA) vem sendo utilizada para minimizar a subjetividade nas análises de sêmen, em diversas espécies animais, incluindo o cão (IGUER-OUADA & VERSEGEN, 2001).

Diversos aparelhos são descritos para a realização da CASA, dentre estes podemos destacar: Hamilton Thorn (HTR analyser, Hamilton Thorn Research, Beverly, EUA), Cell Soft Computer Videomicrography System (Cryo Resources LTDA, Nova York, EUA) e o Sperm Quality Analyser (SQA II, Medical Electronic Systems LTDA- Tirat Carmel, Israel).

A CASA permite avaliação objetiva e precisa das células móveis, além de definir a qualidade do movimento dos espermatozóides. Os dados obtidos por esse método correspondem a centenas de mensurações espermáticas individuais, fornecendo informações sobre qualidade média da motilidade em uma amostra de sêmen (GÜNZEL-APEL et al., 1993).

A análise computadorizada é utilizada também como um meio de classificar algumas sub-populações de espermatozóides. Utilizando imagens digitalizadas de cada célula espermática, as máquinas são aptas a analisar, por processamento algorítmico, as propriedades dos movimentos dos espermatozóides. Os

parâmetros mais comumente reportados no CASA são velocidade retilínea, curvilínea (VERSTEGEN et al., 2002)

2.1.3 Congelação de sêmen

Apesar da inseminação artificial (IA) em cães domésticos ter crescido nas últimas décadas, os estudos realizados ainda não proporcionam um modelo eficiente para a criopreservação do cão doméstico e canídeos silvestres, ameaçados de extinção.

Em 1949, a descoberta da ação crioprotetora do glicerol, por POLGE et al., proporcionou significativo impacto na metodologia da criopreservação de células. A partir daí, o procedimento de criopreservação das células espermáticas vem sendo empregado na espécie canina. Atualmente, a maioria das notificações científicas (ROTA et al., 1999, TSUTSUI et al., 2000), refere-se gestação alcançada utilizando-se diluentes à base de TRIS, gema de ovo e glicerol.

Os diluentes para congelação de sêmen devem possuir nutrientes como fonte de energia (glicose, glicina), tampão contra mudanças de pH (TRIS- ácido cítrico, TES- citrato), possuir osmolaridade e concentração de eletrólitos fisiológicas, antibióticos para prevenção de crescimento bacteriano (penicilina, estreptomicina, neomicina, amicacina), gema de ovo e leite para proteção contra o choque térmico durante a refrigeração, e possuir crioprotetores (glicerol, etilenoglicol) para reduzir danos aos espermatozoides resultantes da congelação e descongelação (LINDE – FORSBERG, 1991; ENGLAND, 1993; BATEMAN, 2001). A utilização de detergentes biológicos no diluente também tem sido descrita por vários autores, como o “Equex STM paste” (PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2003; MARTINS, 2005) e “Orvus ES Paste” (NIZÁŃSKI et al.;2001).

Vários períodos de refrigeração e congelação têm sido descritos para canídeos (FONTBONNE & BADINAND, 1993; SILVA et al., 1996), sendo dependentes do método de envasamento (ROTA, 1998). Rota et al. (2005) concluíram que o método da curva de congelação lenta do sêmen canino apresentou melhores resultados na preservação de membrana espermática, quando comparado com o método de congelação rápida em nitrogênio (sem

resfriamento inicial). HORI et al. (2006) compararam a congelação em N₂ líquido rápida e lenta, com a permanência do sêmen a 5, 7 e 10 cm da coluna de N₂, a -70°C, por 5, 10 e 15 minutos. Os melhores resultados foram do grupo que ficou a 7 cm do nível de N₂ líquido por 10 minutos.

2.2 Análise ultrassonográfica

A ultrassonografia em modo B, devido ao seu desenvolvimento técnico e abrangência de indicações, traz vantagens significativas à exploração animal (FERNANDES, 1996). Trata-se de uma técnica não invasiva e rápida, sendo utilizada em medicina veterinária há muitos anos, incluindo a avaliação de próstata, além de outros órgãos do aparelho reprodutor masculino. PECHMAN & EILTS (1987) identificaram as estruturas anatômicas do trato reprodutivo de touros por meio de ultrassonografia em modo B. Segundo CARVALHO (2004), o modo B é conhecido como “modo de brilho” ou “modo bidimensional”. Neste tipo de representação, a intensidade do eco é visibilizada como um ponto luminoso em um monitor. Quanto maior a reflexão da onda sonora, mais intenso o brilho do ponto luminoso. As diferentes intensidades de brilho determinam, em uma escala de cinza, diversas ecogenicidades, variando de anecóico a hiperecóico.

2.3 Nutrição

No Brasil estima-se que existam aproximadamente 38 milhões de animais de estimação. Destes, 27 milhões são cães e 11 milhões são gatos. O comércio de produtos destinados a estes animais está em crescimento, tanto no mercado nacional quanto no mercado mundial, sendo a alimentação o segmento responsável pelos maiores investimentos. Porém, este crescimento acelerado na produção de alimentos para cães e gatos nem sempre é acompanhado pelo aumento de sua qualidade, isto é, existem no Brasil inúmeras fábricas de ração entretanto poucas se preocupam realmente com a saúde dos animais.

Os desequilíbrios alimentares são diretamente responsáveis ou predis põe a inúmeras doenças ósseas, metabólicas e podem ser potenciais causadores de degeneração testicular, resultando em possível infertilidade em cães (FELDMAN & NELSON, 1996). Sabe-se que, principalmente as deficiências de vitaminas e minerais podem causar transtornos reprodutivos e podem levar a esterilidade. A deficiência de vitamina A interfere na liberação de hormônios gonadotróficos, diminuição da espermatogênese, da esteroidogênese, culminando com degeneração testicular, acúmulo de lípidos em túbulos seminíferos e células de Leydig. A vitamina E pode prevenir a degeneração testicular e sua deficiência também interfere na reprodução, porém o seu papel na fertilidade de machos ainda é obscuro (HAFEZ & HAFEZ, 2003).

Os efeitos de restrições nutricionais sobre a fertilidade são mais perceptíveis nas fêmeas que nos machos. Os animais jovens em crescimento são muito mais susceptíveis ao estresse nutricional do que os adultos. Nos machos, deficiências nutricionais atrasam a puberdade e prejudicam a produção e as características do sêmen. Além disso, a nutrição afeta mais a função endócrina do que a função espermatogênica dos testículos. Fatores nutricionais comuns englobam deficiências calóricas, protéicas e vitamínicas, porém os minerais e os agentes tóxicos também podem ser importantes (HAFEZ & HAFEZ, 2003).

Os efeitos da subnutrição podem ser corrigidos nos animais adultos, o que não acontece com os animais jovens, devido aos danos permanentes provocados no epitélio germinativo dos testículos, durante o crescimento. A obesidade e a superalimentação reduzem a libido e a atividade sexual em carneiros, cachacos e touros, em especial nos dias quentes (HAFEZ & HAFEZ, 2003).

Existem poucas informações referentes aos efeitos de deficiências minerais sobre as funções reprodutivas masculinas. Em touros, tem-se suspeitado da deficiência de iodo como causa de libido insuficiente e características seminais insatisfatórias. Nota-se melhoria da produção espermática e da fertilidade após alimentação suplementada com cobre, cobalto, zinco e manganês nesta mesma espécie (HAFEZ & HAFEZ, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Composição do grupo experimental*

Foram selecionados oito cães da raça Beagle, sadios, machos, adultos, idade média entre 2 a 5 anos, peso médio de 14 kg, do canil do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de cães e gatos, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-FCAV UNESP/ Jaboticabal, condicionados para a colheita de sêmen. O grupo de cães foi homogêneo quanto a idade, peso e origem. O ambiente onde os cães estavam alojados foi o mesmo para todos, sendo canis individuais, com acesso diário a área gramada. Os cães foram vacinados e desverminados regularmente conforme o protocolo utilizado pelo Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, além de serem realizados exames clínicos (exame físico completo) e laboratoriais (avaliações de sangue e urina) ao final de cada período de tratamento.

Os cães foram divididos em três grupos, cada um recebeu uma ração durante cinco meses. Ao final desse período, as rações foram trocadas, para que os cães recebessem todos os tipos ao final de 15 meses. As dietas utilizadas durante o experimento foram compostas por três rações comerciais com composição e níveis nutricionais diferentes. Amostras das rações (A: *Econômica*, B: *Premium*, C: *Super-premium*), foram guardadas e conservadas em freezer a -10°C, para posterior análise no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), do Departamento Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP-Jaboticabal.

Os cães foram alimentados uma vez ao dia e a quantidade oferecida calculada pelo Serviço de Nutrição Clínica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, para a manutenção do peso dos animais. O tratador não poderia informar qual ração cada cão estava consumindo, evitando qualquer influência na avaliação do sêmen.

3.2 Colheita do sêmen

A colheita de sêmen foi realizada em ambiente tranqüilo, pelo método da estimulação digital (mão enluvada), utilizando um funil devidamente limpo, adaptado a tubo coletor cônico de 15 mL. Anteriormente a colheita, o pênis foi higienizado com uma gaze ou compressa seca, para evitar contaminação das amostras. Os primeiros jatos do ejaculado foram descartados, sendo a segunda e terceira frações espermáticas colhidas juntas. As colheitas foram realizadas em média a cada 15 dias.

3.3 Análise do ejaculado

Imediatamente após a colheita, o ejaculado foi mantido em banho-maria a temperatura de 37°C e analisado macro e microscopicamente. A cada período de tratamento, amostras de sêmen de cada cão foram congeladas. O volume foi avaliado pela leitura direta da graduação do tubo coletor. O pH foi mensurado utilizando-se fita para avaliação de pH. A fita impregnada uniformemente pela amostra de sêmen era analisada após 30 segundos, e comparada com a tira de calibragem das fitas colorimétricas, com variação de 0 a 14 (Universalindikator pH 0-14, Merck®).

3.3.1 Análises microscópicas

Motilidade e Vigor

Para avaliação da motilidade espermática, uma gota de sêmen fresco foi colocada entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase, em aumento de 100X. Foi avaliada a porcentagem de células com movimento progressivo.

O vigor foi analisado nessa mesma amostra, durante a visualização da motilidade, quanto a intensidade do movimento progressivo dos espermatozóides, pelo escore de 0 (nenhum movimento) a 10 (movimento retilíneo).

Concentração Espermática

Para determinação da concentração espermática (número de espermatozóides/ mL) foi realizada a diluição do sêmen em 1:20, sendo 50 µL de ejaculado e 950 µL de água destilada ou formol salina tamponado a 10%. Essa diluição foi utilizada para preencher a câmara hematocitométrica de “Neubauer”. Após sedimentação das células espermáticas, a leitura foi realizada em microscópio de contraste de fase, em um aumento de 400X, e o número de células contadas e expressas em espermatozóides por mL.

Morfologia Espermática

Esfregaços foram confeccionados com o sêmen, em lâmina de vidro, fixados em formol salina durante 10 minutos em banho-maria a 37°C, secos em temperatura ambiente e armazenados. Posteriormente, as lâminas foram coradas pelo método de Karras modificado (PAPA et al., 1988); foram contadas 200 células, em microscópio, num aumento de 1000X (imersão), sendo as alterações morfológicas classificadas em defeitos primários e secundários.

3.4 Criopreservação do sêmen

Em pelo menos uma colheita de cada fase dos tratamentos, foi realizada a congelação do sêmen dos cães.

Após serem feitas as análises macro e microscópicas, o ejaculado era centrifugado a 800g, por 10 minutos. O plasma seminal foi descartado e o pellet obtido no fundo do tubo, foi ressuspenso em meio diluente elaborado por Rota et al. (1997), (Tabela 12 do anexo).

A diluição do sêmen foi realizada para concentração mínima de 40×10^6 espermatozóides móveis/ mL. O sêmen diluído foi então envasado em palheta de 0,5 mL, lacrada com álcool polivinílico, identificada devidamente e levada a um refrigerador, com temperatura constante de 5°C, por uma hora.

A congelação das palhetas foi inicialmente feita em vapor de nitrogênio. As palhetas foram mantidas sob o vapor, posicionadas a 6 cm da coluna de

nitrogênio líquido (N_2), em uma caixa de isopor apropriada, durante 20 minutos. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas no N_2 líquido e, posteriormente, armazenadas em botijão criogênico.

3.4.1-Avaliação do sêmen criopreservado

A descongelação das palhetas foi realizada em banho-maria a 70°C, por 8 segundos, conforme estudo de Martins (2005). Logo em seguida, foram realizadas novas avaliações do sêmen, sendo incluída a avaliação computadorizada (CASA), utilizando o equipamento Hamilton Thorn (HTR analyser, Hamilton Thorn Research, Berverly, EUA), no departamento de Reprodução Animal da FMVZ UNESP/ Botucatu, além da avaliação da morfologia espermática conforme descrito anteriormente para o sêmen fresco. Foram avaliadas as sub-populações quanto ao tipo de movimento, velocidade, linearidade, amplitude lateral.

3.5 Mensuração e avaliação ultrassonográfica de testículos e próstata

A mensuração testicular de cada animal foi realizada a cada 5 meses, com auxílio de paquímetro, sendo a primeira antes do início e a última no último dia do tratamento. Foi também realizada a avaliação ultrassonográfica dos testículos no final do tratamento, verificando ecogenicidade de parênquima. A avaliação prostática foi realizada juntamente com a ultrassonografia dos testículos, para avaliação do parênquima destes órgãos.

3.6 Análise estatística

A análise de variância de medidas repetidas foi o método estatístico utilizado para avaliar as variáveis estudadas. As médias das variáveis de cada grupo, nos três períodos, foram comparadas por meio do teste de Tukey, sendo o valor de

$p < 0,05$ considerado significativo. Devido ao coeficiente de variação alto, algumas variáveis foram transformadas (logaritmo), porém os resultados foram os mesmos.

4. RESULTADOS

A adaptação dos cães em baias individuais foi de maio de 2007, sendo um período de três meses considerado mínimo (anteriormente viviam juntos em piquetes na zona rural), com acesso diário ao solário e gramado a cada 2 dias. O resultado dessa adaptação foi satisfatório, sendo o trabalho conduzido conforme o esperado. Os cães iniciaram a dieta com ração comercial Premium, igual para todos, uma vez que comiam rações diversas, anteriormente ao experimento. A fase de adaptação nutricional e ambiental foi realizada no mesmo período.

O condicionamento à colheita de sêmen foi iniciado em julho deste ano de 2007, sendo a estimulação feita semanalmente, até resposta dos cães. Observou-se que os mais jovens foram condicionados mais rapidamente. O início da avaliação do sêmen foi em agosto, sendo considerado como controle, antes do início dos tratamentos.

No início de agosto, os cães foram avaliados clínico e laboratorialmente, 7 dos 8 cães apresentavam hemoparasitose. Assim, antes do início do tratamento com as rações, os cães receberam medicamentos apropriados, recomendados por docente do departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP de Jaboticabal, com boa evolução após 25 dias do diagnóstico da afecção. Os resultados médios dos exames laboratoriais durante o experimento, realizados após avaliação clínica dos cães, encontram-se nas tabelas 8 a 10 do apêndice. A idade dos animais encontra-se na tabela 11 do apêndice.

O início da alimentação com as três rações comerciais foi realizada no dia 01/10/07. A pessoa responsável pela avaliação andrológica não era informada sobre a ração que cada cão estava ingerindo. A partir dessa data, a avaliação passou a ser experimental, com amostras já congeladas na primeira fase. As colheitas de sêmen foram realizadas a cada 15 dias. A troca da ração foi realizada a partir do dia 01/03/2008 e a terceira mudança a partir do dia 01/08/2008. Na tabela 1, seguem os níveis de garantia fornecidos no rótulo das rações e a análise bromatológica comparada aos níveis de garantia fornecidos pelos fabricantes.

Tabela 1- Níveis de garantia dos produtos fornecidos aos animais durante o estudo, A (Econômica), B (Premium) e C (Super premium) e análise química, Jaboticabal/SP, 2009.

Nutrientes	Níveis de garantia			Composição química		
	Ração A	Ração B	Ração C	Ração A	Ração B	Ração C
Umidade	12	12	12	9,35±1,0	8,84±0,8	8,35±0,5
Proteína	18	19	26	14,56±1,53	19,11±1,0	25,85±0,7
Bruta						
Extrato	6	7,5	15	9,78±1,4	9,11±0,9	14,11±0,7
Etéreo						
Fibra Bruta	6	5	3	3,40±0,9	3,10±0,5	3,42±1,0
Matéria	12	9	7	8,37±1,5	7,51±0,6	5,87±0,9
Mineral						
Cálcio (Ca)	2	2	1,6	1,64±0,26	2,0±0,14	0,78±0,12
Fósforo (P)	0,7	0,8	0,9	1,02±0,16	1,17±0,5	0,67±0,09
Ca/P	2,85	2,5	1,77	1,5±0,5	1,7±0,4	1,15±0,3

A avaliação andrológica dos cães incluiu a análise de sêmen fresco, avaliação por palpação e inspeção, além de medida dos testículos e avaliação ultrassonográfica de testículos e próstata. A colheita de sêmen foi realizada pela técnica de manipulação digital (figura 1), em média a cada 15 dias, com auxílio de tubo coletor cônico de 15 mL e funil. Devido a alterações do ejaculado, algumas amostras foram descartadas.



Figura 1- Imagem fotográfica da colheita de sêmen de cão da raça Beagle, pela técnica da manipulação digital, com auxílio de tubo coletor cônico adaptado a um funil.

Ao longo do experimento, foram realizadas 246 colheitas, sendo em média, 10 colheitas por animal em cada período de tratamento.

As médias dos dados obtidos estão representadas na tabela 2, a seguir, e análise estatística apresentada na tabela 3. A representação gráfica dos resultados encontram-se nas figuras 2 a 6, e a morfologia espermática na figura 7.

Tabela 2- Parâmetros médios do sêmen de cães da raça Beagle, alimentados com três rações comerciais (A: Econômica, B: Premium, C: Super Premium), Jaboticabal/SP, 2009.

Ração	Animal	Cor	Odor	Volume (mL)	Motilidade (%)	Vigor (0-10)	pH	Concentração (sptz X 10⁶/mL)	Sptz totais (x 10⁶)	Defeitos primários (%)	Defeitos secundários (%)	Defeito Totais (%)
A		L	caract	1,47	87	8	6-7	347,9	416,97	0,09	5,5	5,6
B	1	L	caract	1,61	81	7,44	6-7	257,4	289,61	0	4,6	4,6
C	(Billy)	L	caract	1,28	88	8,36	6-7	267,2	331,93	0	2,3	2,3
A		L	caract	1,87	78	7,09	6-7	226,0	362,1	0	8,8	8,8
B	2	L	caract	2,0	80	7,33	6-7	262,9	476,6	0	4,2	4,2
C	(Biscoito)	L	caract	2,39	82	7,55	6-7	337,5	742,7	0	2,3	2,3
A		L	caract	1,59	66	5,82	6-7	226,5	354,9	0	3,7	3,7
B	3	L	caract	1,38	80	7,78	6-7	169	222,4	0	2,4	2,4
C	(Bolero)	L	caract	1,18	83	7,36	6-7	220,6	217,8	0	2,6	2,6
A		L	caract	1,57	67	6,44	6-7	236,1	283,8	0	3,9	3,9
B	4	L	caract	1,17	70	6,45	6-7	182,8	211,5	0	3,0	3,0
C	(Chorão)	L	caract	1,29	65	6,0	6-7	225,9	277,5	0	4,9	4,9
A		L	caract	1,74	79	7,11	6-7	246,0	315,3	0	5,7	5,7
B	5	L	caract	1,29	82	7,64	6-7	223,9	263,7	0	4,2	4,2
C	(Chapéu)	L	caract	1,38	79	7,0	6-7	174,3	247,1	0,22	7,1	7,32
A		L	caract	1,69	88	7,89	6-7	307,2	489,3	0	5,0	5,0
B	6	L	caract	2,06	89	8,27	6-7	268,5	528,1	0,09	4,0	4,09
C	(Plano)	L	caract	1,53	88	8,27	6-7	278,0	381,5	0	6,7	6,7

continua

A		L	caract	3,52	90	8,45	6-7	222,6	714,5	0	2,5	2,5
B	7	L	caract	2,94	85	7,72	6-7	155,8	444,4	0	4,1	4,1
C	(Rancho)	L	caract	3,18	88	8,0	6-7	206,2	605,4	0	3,2	3,2
A		L	caract	1,48	88	8,45	6-7	333,2	481,6	0	4,7	4,7
B	8	L	caract	1,32	89	8,0	6-7	389,0	455,3	0	5,1	5,1
C	(Tang)	L	caract	1,2	90	8,0	6-7	454,5	490,1	0	9,8	9,8

L: leitoso

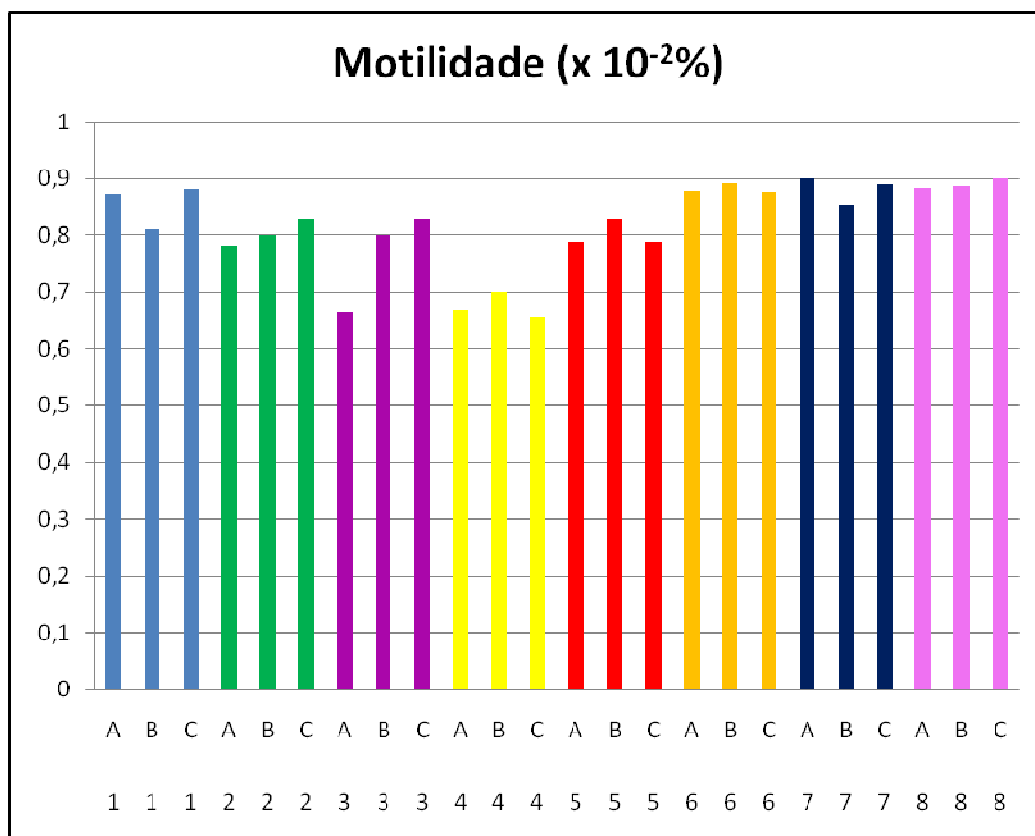


Figura 2- Representação gráfica das médias de motilidade espermática ($\times 10^{-2}\%$) do sêmen de cães da raça Beagle (1 a 8), durante o período de tratamento com três rações comerciais (A: Econômica, B: *Premium* e C: *Super Premium*).

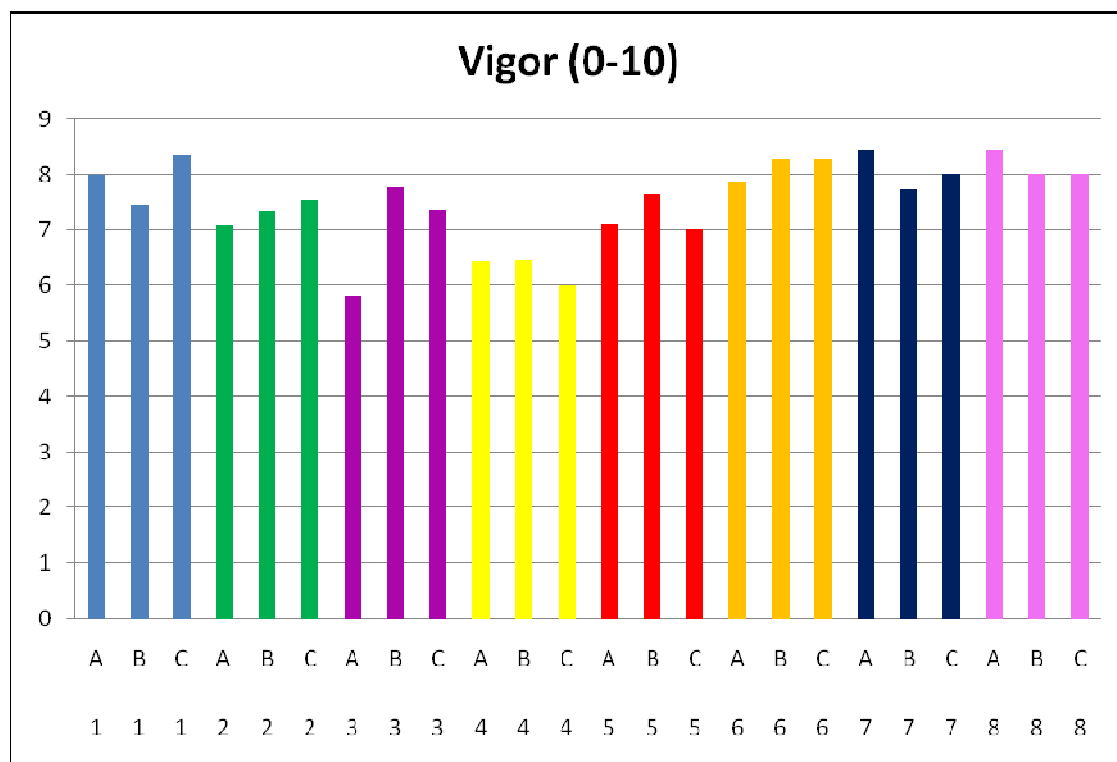


Figura 3- Representação gráfica do vigor espermático (notas de 0 a 10) do sêmen de cães da raça Beagle (1 a 8), durante o período de tratamento com três rações comerciais(A: Econômica, B: *Premium* e C: *Super Premium*).

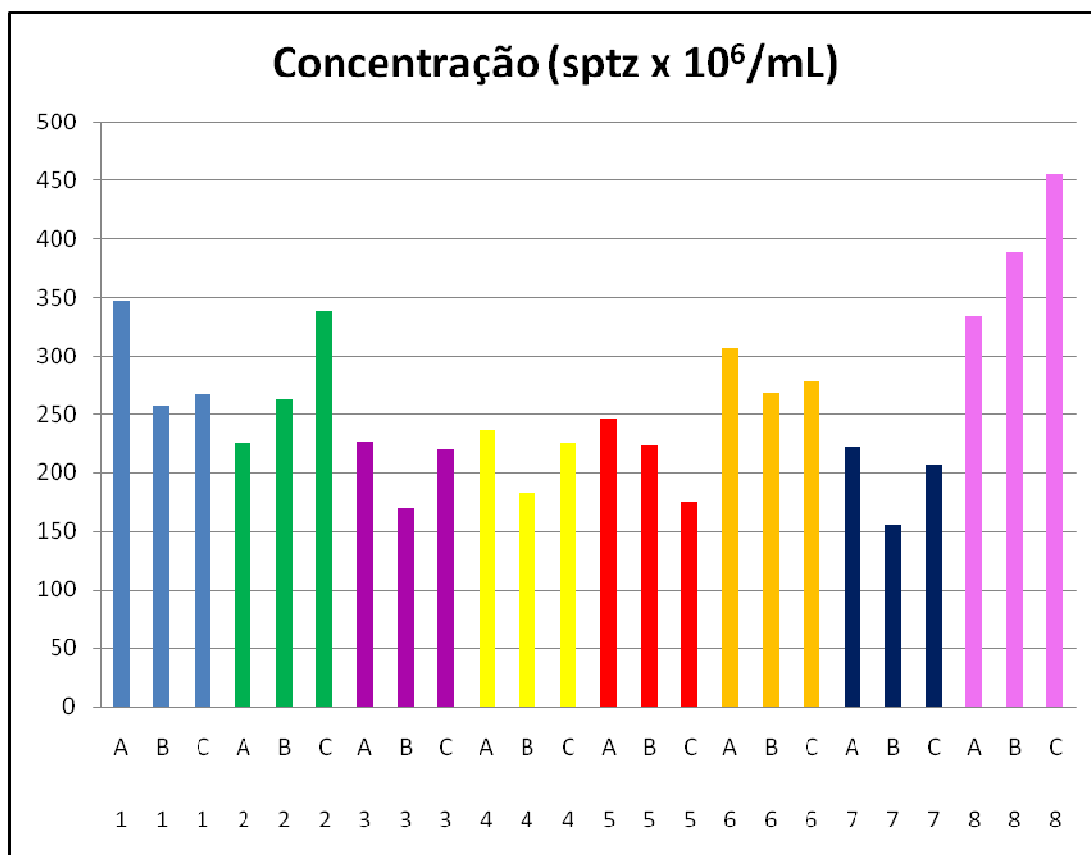


Figura 4- Representação gráfica das médias de concentração espermática (nº de espermatozoides X 10⁶/mL) do sêmen de cães da raça Beagle (1 a 8), durante o período de tratamento com três rações comerciais(A: Econômica, B: *Premium* e C: *Super Premium* C).

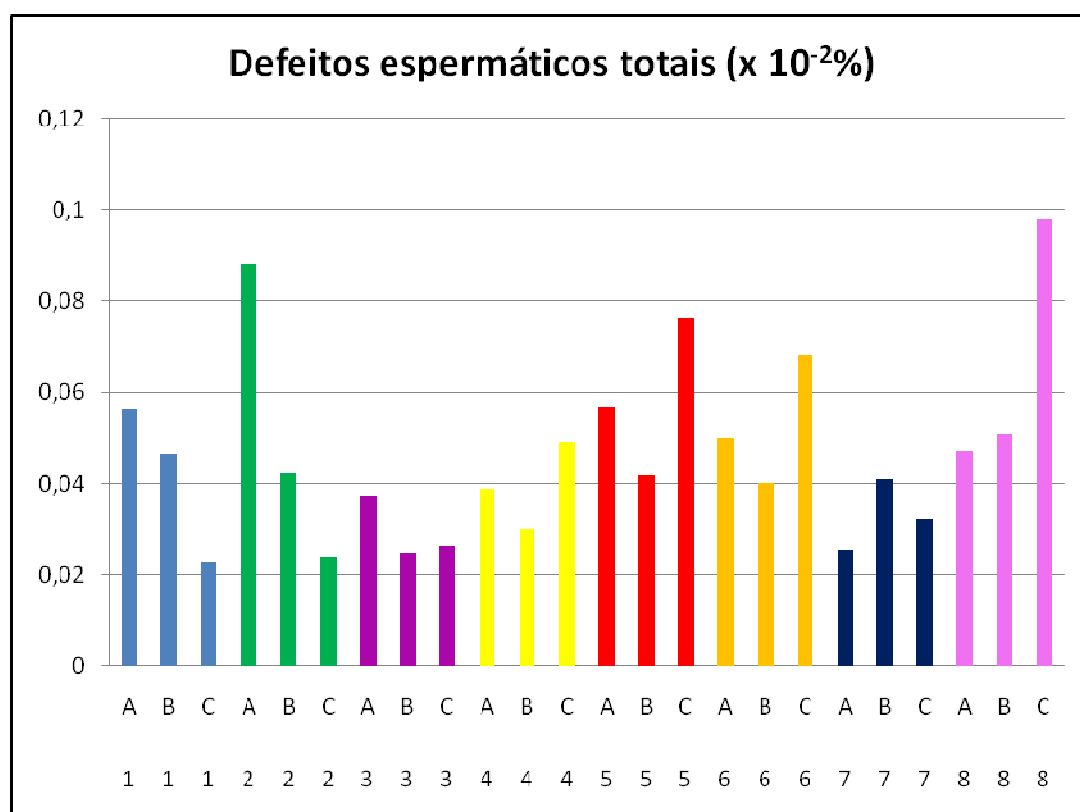


Figura 5- Representação gráfica das médias de defeitos espermáticos totais ($\times 10^{-2}\%$) do sêmen de cães da raça Beagle (1 a 8), durante o período de tratamento com três rações comerciais (A: Econômica, B: *Premium* e C: *Super Premium*).

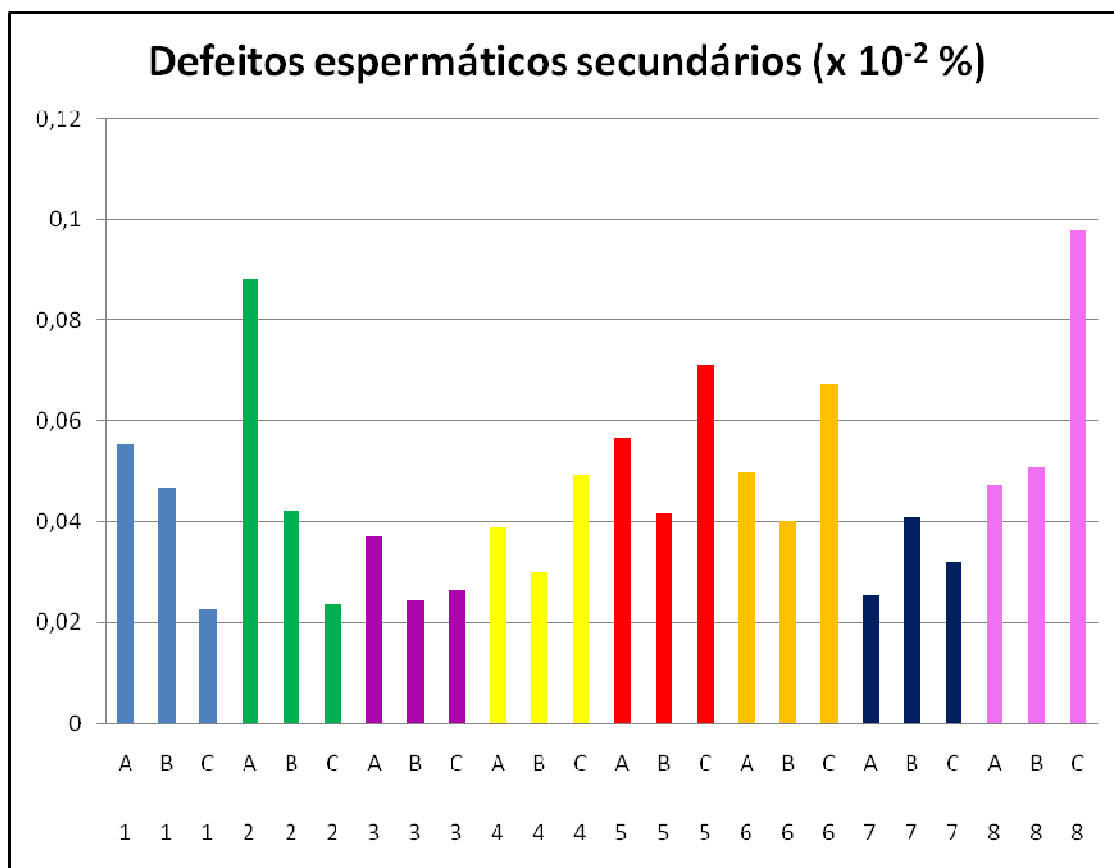


Figura 6- Representação gráfica das médias de defeitos espermáticos secundários ($\times 10^{-2} \%$) do sêmen de cães da raça Beagle (1 a 8), durante o período de tratamento com três rações comerciais (A: Econômica, B: *Premium* e C: *Super Premium*).

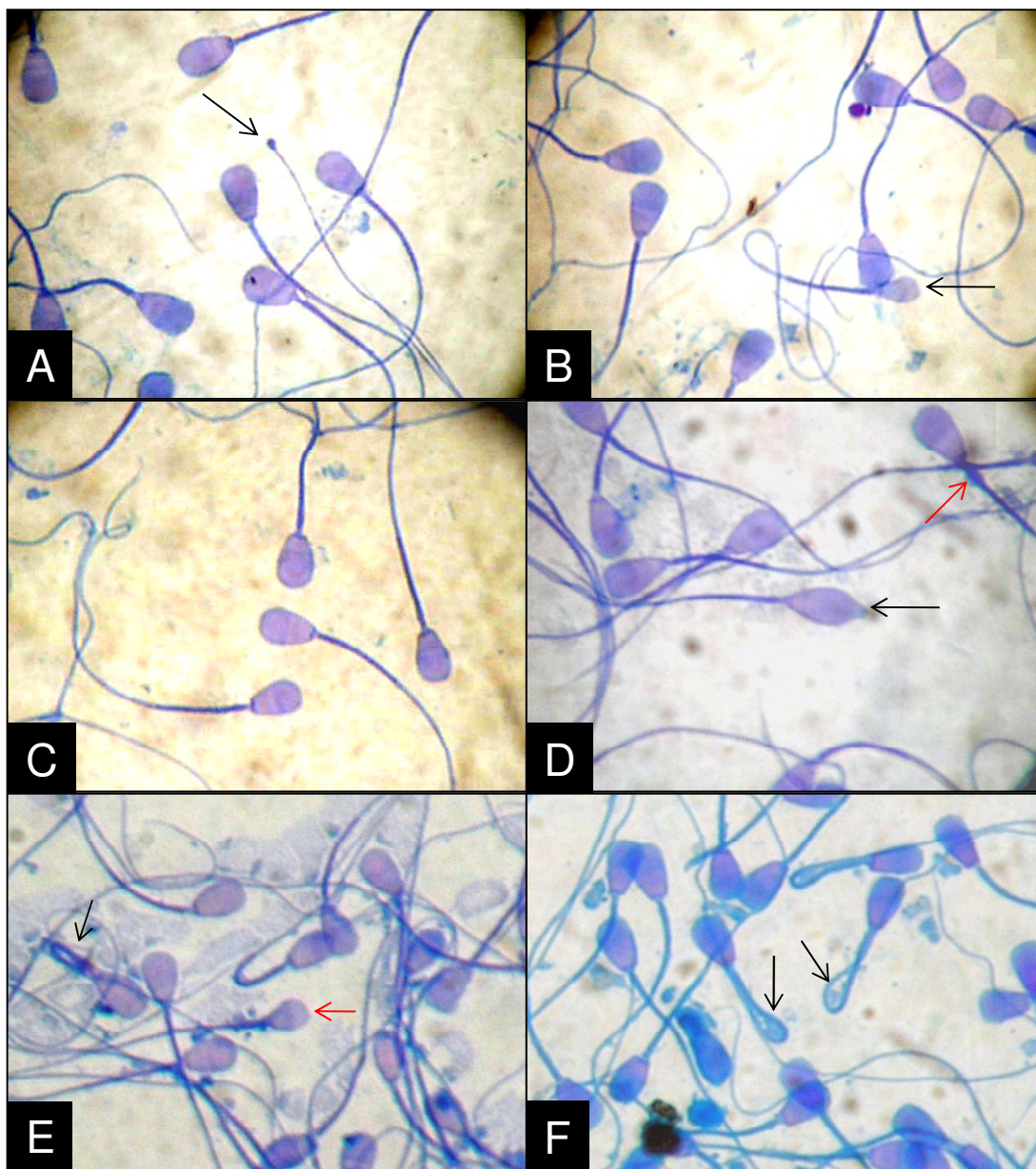


Figura 7- Fotomicrografia das lâminas de sêmen canino coradas pelo método de Karras modificado, ao exame microscópico de luz (Objetiva de 100X, sob imersão em óleo). Em A, a seta indica o defeito espermático de microcefalia. Em B, a seta indica destacamento de acrossomo em espermatozóide com deformidade de cabeça (diminuída). Em C, espermatozóides normais. Em D, seta preta indica defeito de acrossomo, e a vermelha indica gota citoplasmática proximal. Em E, a seta preta indica cauda fortemente enrolada e a vermelha, destacamento de acrossomo. Em F, as setas indicam caudas fortemente enroladas com gota.

Tabela 3- Médias e desvios padrão de motilidade espermática (%), vigor(0-10), concentração (espermatozóides X 10⁶/mL), espermatozóides totais no ejaculado (X 10⁶) e defeitos na morfologia espermática (%), de cães da raça Beagle, tratados com três rações comerciais, Jaboticabal/SP, 2009.

Parâmetros	Ração A (Econômica)		Ração B (Premium)		Ração C (Super Premium)	
Motilidade (%)	80,6 ±11,00	A	82,3 ±10,00	A	82,8 ±9,80	A
Vigor (0-10)	7,42 ±1,24	A	7,58 ±1,04	A	7,56 ±1,03	A
Concentração (sptz X 10⁶/mL)	268,57 ±146,7	A	239,32 ±168,7	A	269,96 ±138,1	A
Espermatozóides totais (X 10⁶)	432,04 ±212,04	A	363,80 ±232,8	A	409,13 ±232,9	A
Defeitos espermáticos (%)	5,0 ±3,4	A	3,9 ±1,8	A	4,7 ±6,0	A

* Médias com letras diferentes nas linhas, diferem significativamente pelo teste de Tukey (p< 0,05).

Para a congelação, depois de obtida a concentração espermática, o sêmen foi centrifugado, e o “pelet” resultante diluído em meio diluidor já descrito (composição descrita na tabela 12 do apêndice). A concentração final foi de no mínimo 40 X 10⁶ sptz/mL e congeladas em palhetas de 0,5 mL. As amostras foram estocadas em botijão criogênico para posterior avaliação (figura 8). As amostras foram levadas ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/UNESP de Botucatu, para serem descongeladas, submetidas a análise computadorizada (CASA) (figura 9) e realização de esfregaços com o sêmen descongelado, para verificar a morfologia espermática pós-descongelação. Os resultados obtidos estão representados na tabela 4 e a análise estatística na tabela 5.

Os resultados da biometria dos testículos, com auxílio de paquímetro, estão representados na tabela 6. Um dos cães apresentava assimetria testicular (o testículo direito era menor que o contralateral), porém não foi retirado do grupo experimental. A avaliação ultrassonográfica de próstata e testículos foi realizada no ao laboratório de Radiologia do Hospital Veterinário Laudo Natel, da FCAV/UNESP de Jaboticabal (figura 10). As medidas das próstatas dos cães obtidas estão representadas na tabela 7.



Figura 8- Imagem fotográfica do botijão criogênico contendo N_2 líquido, para estoque das amostras de sêmen congelado.

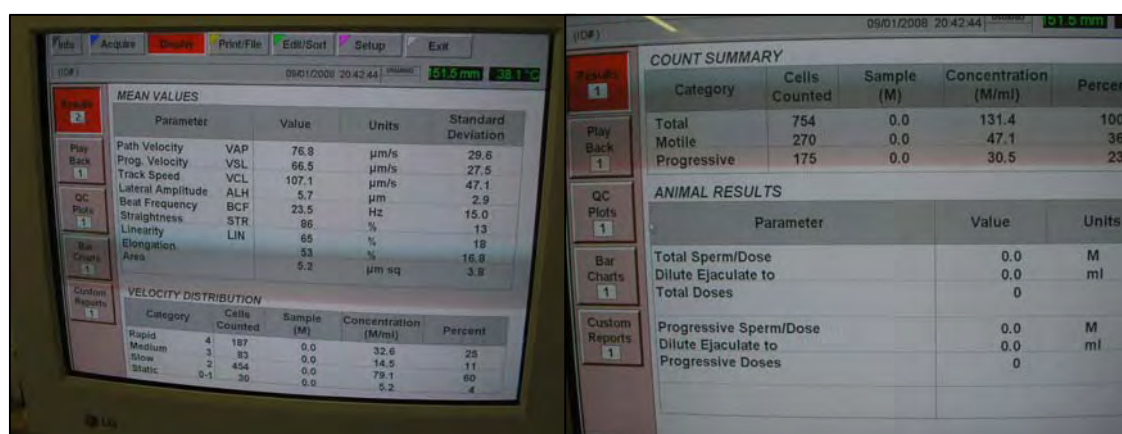


Figura 9- Imagem fotográfica do aparelho Hamilton Thorn (HTR analyser, Hamilton Thorn Research, Berverly, EUA), durante análise computadorizada do sêmen canino, pós descongelação.

Tabela 4- Principais parâmetros do sêmen canino, pós-descongelamento, de cães da raça Beagle, tratados com três diferentes rações comerciais (A: Econômica, B: *Premium*, C: *Super Premium*), Jaboticabal/SP, 2009.

Ração	Animal	Motilidade (%)	Movimento Progressivo (%)	Velocidade (% espermatozoides)				Estático	Morfologia (%)	
				Rápida	Média	Lenta			defeitos secundários(%)	defeitos primários(%)
A	1 (Billy)	66	50	53	13	32		2	4	0
B		38	15	19	19	59		3	3	0
C		41	25	27	14	54		5	4	0
A	2 (Biscoito)	23	16	17	6	34		43	6	0
B		36	31	32	4	53		11	4	0
C		36	22	28	8	57		8	5	0
A	3 (Bolero)	51	39	40	11	43		6	3	0
B		49	40	42	7	45		6	3	0
C		24	16	16	8	53		23	2	0
A	4 (Chorão)	20	9	10	10	58		2	3	0
B		35	21	23	12	63		2	2	0
C		51	34	36	16	44		4	3	0
A	5 (Chapéu)	44	19	22	23	52		4	6	0
B		34	15	16	18	48		18	3	0
C		41	17	18	23	51		8	6	0
A	6 (Piano)	48	24	29	19	50		2	6	0
B		24	12	12	12	68		8	4	0
C		38	13	14	24	51		11	2	0
A	7 (Rancho)	43	26	30	13	56		1	3	0
B		34	16	19	15	64		2	2	0
C		47	19	22	25	53		0	4	0
A	8 (Tang)	52	32	38	15	47		0	8	0
B		29	16	18	11	68		3	4	0
C		40	30	34	6	57		3	4	0

Tabela 5- Médias e desvios padrão de motilidade espermática (%), movimento progressivo (%) e defeitos na morfologia espermática (%), do sêmen pós-descongelamento, de cães da raça Beagle, alimentados com três rações comerciais (A: Econômica, B: *Premium*, C: *Super Premium*), Jaboticabal/SP, 2009.

Parâmetros	Ração A (Econômica)		Ração B (Premium)		Ração C (Super Premium)	
Motilidade (%)	43,37 ±15,00	A	34,87 ±7,00	A	39,75 ±7,90	A
Movimento progressivo (%)	26,87 ±24,00	A	20,75 ±90	A	22 ±7,20	A
Defeitos espermáticos (%)	4,87 ±1,00	A	3,12 ±0,80	B	3,75 ±1,30	AB

* Médias com letras diferentes nas linhas, diferem pelo teste de Tukey (p< 0,05).

Tabela 6- Medidas do testículo direito (D) e esquerdo (E) de cães da raça Beagle, obtidas com paquímetro, alimentados com três rações comerciais (A: Econômica, B: *Premium*, C: *Super Premium*), Jaboticabal/SP, 2009.

Ração	Animal	Testículo direito		Testículo esquerdo	
		Comprimento (cm)	Largura (cm)	Comprimento (cm)	Largura (cm)
A	1	4,5	3,5	4	3
B	(Billy)	4,5	3,5	4	3,5
C		4,5	3,5	4	3
A	2	4	3,5	4	3
B	(Biscoito)	4	3,5	4	3,5
C		4	3,5	4	3
A	3	4	3	4	3,5
B	(Bolero)	4	3,5	4	3,5
C		4	3	4	3,5
A	4	2,5	2	4	3,5
B	(Chorão)	2,5	2	4	3,5
C		2	2	5	3,5
A	5	4,5	4	4	3
B	(Chapéu)	4,5	4	4	3
C		4,5	3,5	4	3
A	6	4	3,5	4	3
B	(Piano)	4	3,5	4	3
C		4	3	4	3
A	7	4,5	3	4,5	3,5
B	(Rancho)	5	4	4,5	4
C		5	4	4,5	4
A	8	4	3	4	3
B	(Tang)	4	3,5	4	3
C		4	3,5	4	3

Tabela 7- Biometria de próstata dos cães da raça Beagle, tratados com três rações comerciais diferentes (A: Econômica, B: *Premium*, C: *Super Premium*), obtidas por exame ultrassonográfico, Jaboticabal/SP, 2009.

Ração	Animal	Testículo direito		Testículo esquerdo	
		Comprimento (cm)	Largura (cm)	Profundidade L (cm)*	Profundidade T (cm)**
A	1	2,42	3,29	2,05	1,98
B	Billy	1,68	3,29	2,85	1,98
C		2,3	3,3	2,9	2,1
A	2	3,01	3,18	2,00	1,70
B	Biscoto	2,97	3,57	3,47	3,88
C		3,1	3,2	3,5	3,7
A	3	3,17	3,00	1,83	2,31
B	Bolero	2,79	2,53	3,5	3,35
C		2,89	3,2	3,5	3,3
A	4	3,35	3,2	1,8	3,0
B	Chorão	2,50	3,00	1,50	1,67
C		3,25	3,18	1,74	2,93
A	5	3,4	2,5	1,9	3,1
B	Chapéu	2,90	3,74	3,07	2,54
C		3,34	2,46	1,91	3,01
A	6	2,5	3,7	3,4	2,2
B	Piano	2,33	3,11	1,88	2,44
C		2,34	3,78	3,41	1,84
A	7	3,55	2,45	2,12	3,41
B	Rancho	3,6	2,6	2,2	3,5
C		2,50	3,29	2,30	2,10
A	8	1,44	2,45	2,78	2,72
B	Tang	2,1	2,6	2,8	2,9
C		1,69	2,52	1,54	1,04

* Profundidade L: longitudinal

** Profundidade T: transversal

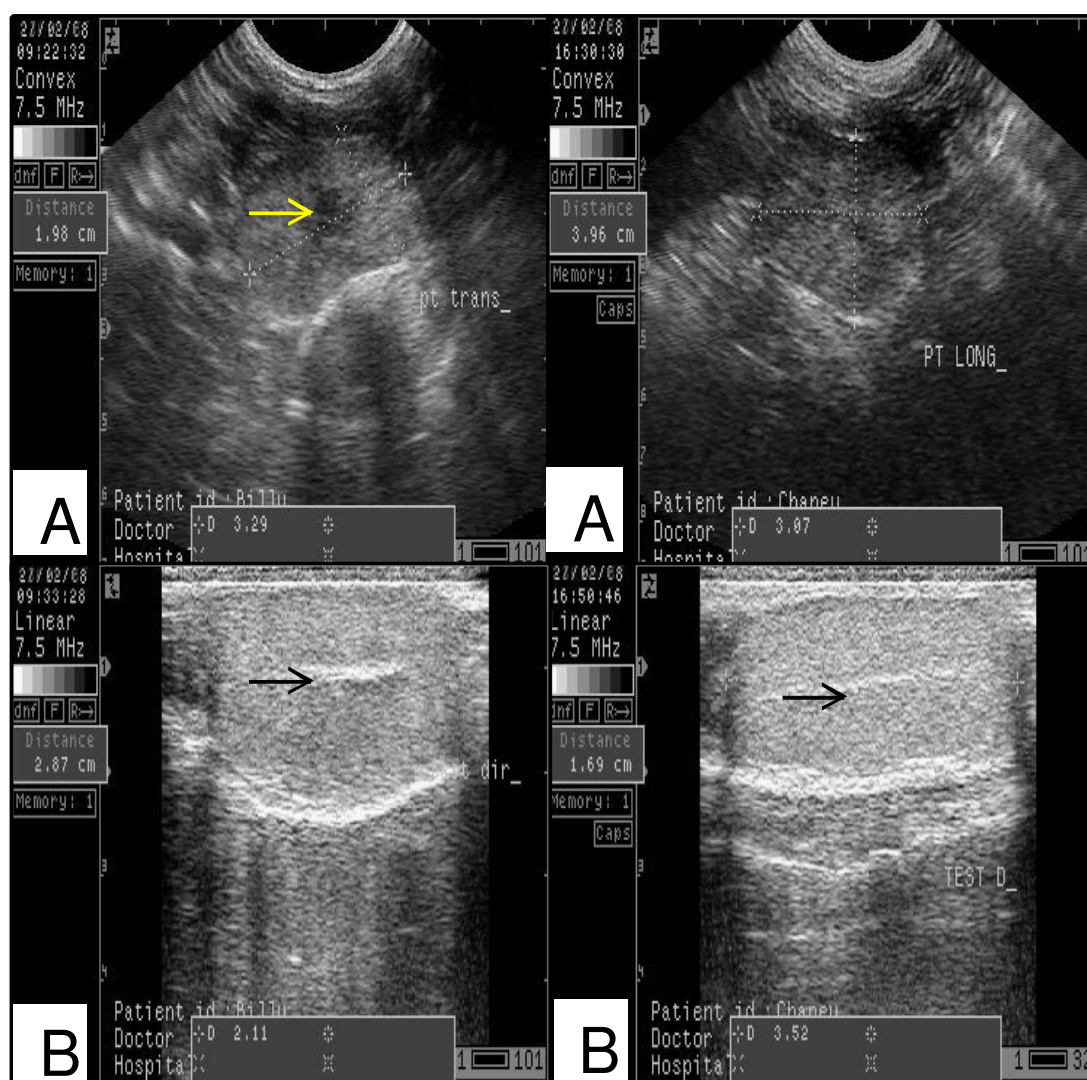


Figura 10- Imagem fotográfica do exame ultrassonográfico de próstata (A) e testículo (B), de cães da raça Beagle, alimentados com três rações comerciais diferentes. Em A, a seta amarela indica o corte transversal da uretra prostática. Em B, as setas pretas indicam o *mediastinum testis*.

O exame ultrassonográfico de alguns cães indicou certa hiperplasia prostática, compatível com a idade dos cães. As alterações encontradas não interferiam no experimento, pois a qualidade do sêmen, nestes indivíduos, não foi alterada.

5. DISCUSSÃO

No início do relacionamento homem-cão, os cães tinham função essencialmente de trabalho, principalmente em caçadas. Com o passar do tempo estes animais passaram a desempenhar uma função de companhia. No Brasil estimava-se em 2003 que existiam aproximadamente 38 milhões de animais de estimação, destes, 27 milhões são cães e 11 milhões são gatos (HAFEZ & HAFEZ, 2003). Os produtos destinados a estes animais estão em crescimento, tanto no mercado nacional quanto no mercado mundial, sendo a alimentação o segmento responsável pelos maiores investimentos (CARCIOFI, 2003).

O potencial do mercado brasileiro está muito além dos resultados obtidos, tendo um consumo potencial de 4,11 milhões de toneladas/ano. Hoje há 32 milhões de cães, 19,5 milhões de pássaros, 16 milhões de gatos, 7,5 milhões de peixes e 2 milhões outros. Esses números levam o Brasil, no mercado mundial, ao segundo lugar em população de cães e gatos, o sétimo lugar em população de animais de companhia, o segundo em volume de produção e o sétimo em faturamento. Porém, hoje, os alimentos industrializados têm um abastecimento de 1,78 milhão de toneladas, o que representa apenas 43,32% da demanda total de alimentos (ANFAL Pet, 2008)

Desde 1994, anualmente a Associação Americana de Controladores de Alimentos (AAFCO, 2003), vem publicando suas recomendações nutricionais para cães e gatos. Nestas recomendações foram levados em consideração fatores como: variabilidade na composição nutricional dos ingredientes, especialmente derivados de origem animal, variação analítica de resultados laboratoriais, biodisponibilidade dos nutrientes presentes nos ingredientes em uso, interações nutricionais, margem de segurança para diferenças entre indivíduos e raças, perdas em processamento e estocagem. Em função das considerações acima recomendações foram levados em consideração os fatores enumerados acima, as recomendações da AAFCO são mais apropriadas na formulação e avaliação de alimentos comerciais (CARCIOFI, 2003).

O maior volume de ração comercializado no Brasil é representado pelos produtos de baixo custo (de combate ou mais recentemente nomeados econômicos), cujo principal objetivo é a venda. Para serem fabricados utilizam ingredientes mais baratos, possuem processamento padrão e se adequam apenas a análise de rótulos. Apresentam, normalmente, baixa digestibilidade, baixos teores de proteína e gordura, altos teores de fibra e levam o animal a produzir quantidade elevada de fezes.

Alimentos *premium* constituem as marcas fortes dos fabricantes, que investem em “marketing”, cujo apelo principal é a palatabilidade e a digestibilidade. São produzidos com ingredientes de melhor qualidade. Apresentam digestão intermediária e sua adequação nutricional é acessada por análises químicas mais detalhadas a algumas vezes pelo teste de digestibilidade *in vivo*.

Os produtos *super premium*, tem como foco principal à qualidade. São produzidos com ingredientes especiais e com atribuições e funções específicas no conjunto da fórmula, mediante processamento diferenciado, tornando-os mais onerosos. Apresentam maior densidade nutricional (alta proteína, gordura e energia), digestibilidade e palatabilidade (CARCIOFI, 2003).

Os desequilíbrios alimentares são diretamente responsáveis ou predisõem a inúmeras doenças ósseas e metabólicas como a obesidade, diabetes melitus e dermatopatias. É importante o uso de alimentos de boa qualidade, pois este oferece equilíbrio nutricional e regularidade obtida entre as refeições. Cães e gatos necessitam de 40 a 45 nutrientes que devem ser ingeridos em quantidades adequadas e proporções corretas.

As funções reprodutivas, nas diversas espécies de mamíferos, parecem sofrer mais com as restrições ou excessos alimentares em jovens que nos adultos. As restrições energética e protéica podem resultar em danos gonadais e neuronais permanentes nos jovens. Em adultos, pode ocorrer diminuição da secreção de andrógenos e da qualidade do sêmen, porém esses efeitos são temporários; com a correção da dieta, funções reprodutivas retornam a normalidade (BROWN, 1994). Tendo em vista a importância da nutrição na

qualidade do sêmen das diversas espécies de animais, o cão pode ser utilizado como modelo experimental, por seu fácil manejo.

Os cães utilizados foram selecionados por serem de faixa etária próxima (adultos), uma vez que a qualidade seminal poderia ser diferente em animais muito jovens ou velhos. FELDMAN & NELSON (1996) evidenciaram que vários fatores interferem na qualidade do sêmen, dentre eles estão: idade (animais jovens apresentam maior número de espermatozóides defeituosos, que diminui conforme se tornam maduros), frequência de ejaculação (exaustão das reservas do epidídimo levando a diminuição da concentração espermática), tamanho dos testículos (correlação entre tamanho de testículos e concentração espermática), doenças pré-existentes sistêmicas ou genito-urinárias, trauma, estresse, desordens endócrinas na secreção de testosterona, FSH, LH, GnRH, além da época do ano.

Cada animal passou previamente por seleção que consistiu de avaliação clínica. No período das colheitas, o estado geral do animal foi novamente observado, para descartar possíveis causas de alterações nos parâmetros seminais, que não fosse pelo tratamento. O tempo de cada tratamento (cinco meses) poderia influenciar pelo menos dois ciclos espermáticos. Possíveis deficiências nutricionais que afetam a reprodução poderiam alterar a qualidade do sêmen desses cães. Todos os tipos de ração foram ingeridas ao longo do ano, evitando um possível efeito de sazonalidade na qualidade do sêmen, conforme descrevem FELDMAN e NELSON (1996) e HAFEZ & HAFEZ (2003), apesar de MARTINS (2005) concluir em seu trabalho que os parâmetros seminais pré e pós congelamento não se alteram com a época do ano.

No decorrer dos anos, diversos testes foram desenvolvidos para avaliar a qualidade das amostras seminais nas diferentes espécies. Porém, apenas recentemente as relações entre os mesmos estão sendo aos poucos desvendadas (HERRERA *et al.*, 2004; QUINTERO-MORENO *et al.* 2004). A metodologia utilizada nesse trabalho é recomendada por diversos autores como MARTINS (2005), CHIRINÉA (2008) e reproduzida mundialmente. Os parâmetros macroscópicos e microscópicos do sêmen foram avaliados. Para

isso, foi estabelecido um limite mínimo de qualidade para uso das amostras de cada animal, de acordo com os valores observados dos mesmos.

Apesar de um dos cães apresentar um dos testículos menor que o contralateral (testículo direito do animal Chorão), e este não foi excluído do grupo experimental. A avaliação do sêmen desse animal refletiu pouco na qualidade do sêmen, comparado com os outros cães e, em média, aceitável.

Todos os valores da análise do sêmen obtidos encontraram-se dentro da faixa normal descrita para a espécie canina, ao longo do experimento (OETTLÉ, 1993; JOHNSTON et al., 2001).

Os cães que compuseram o grupo experimental apresentavam qualidade de sêmen considerado bom, com médias de motilidade e vigor em torno de 80% e 7,5, respectivamente. O sêmen congelado apresentou grande queda na motilidade, mas isso ocorreu nos três grupos de tratamento, ou seja, provavelmente foi influenciado pela técnica de congelação. Os resultados de motilidade pós-descongelação tiveram média de 40%, diferente dos autores CHIRINÉA (2008) 78%; PENA E LINDE-FORSBERG (2000) 65% e MARTINS (2005) próximo de 50%. Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da nutrição na qualidade do sêmen fresco e congelado, e para isso, a técnica de congelação foi padronizada, de acordo com a técnica descrita por MARTINS (2005), com algumas modificações.

O vigor no sêmen fresco foi avaliado de forma subjetiva, por pontuação, conforme sugere a literatura consultada (FELDMAN & NELSON, 1996; CBRA, 1998; JOHNSTON et al., 2001, MARTINS, 2005, CHIRINÉA, 2008). O equivalente para o sêmen congelado foi a avaliação da porcentagem de células móveis em movimento progressivo avaliados pela técnica computadorizada (CASA). Os resultados obtidos também foram baixos, porém não variaram entre os grupos de rações, conforme as tabelas 4 e 5. O método de avaliação computadorizada (CASA) apresenta resultados de forma mais objetiva, retirando o efeito do observador (RIJSSELAERE et al., 2005).

A concentração espermática variou pouco ao longo dos tratamentos, não apresentando diferenças significativas. Segundo Oéttle (1993), existe correlação

positiva entre motilidade, vigor e concentração e negativa com defeitos de morfologia, na avaliação da qualidade do sêmen. Essa informação condiz com os resultados encontrados neste trabalho, apesar de não termos realizado análises para confirmar tal correlação, observamos que os melhores resultados apresentavam alta concentração, boa motilidade e vigor, e menor quantidade de defeitos de morfologia.

O exame morfológico dos espermatozóides mostrou um número baixo de defeitos, sendo 99% defeitos secundários (edema ou destacamento de acrossomo, cabeça e cauda livre, gotas citoplasmáticas, cauda enrolada ou fortemente enrolada). Alguns desses defeitos encontrados podem ser causados pela manipulação, choque térmico e processo de congelamento. Defeitos, principalmente os de cabeça, podem afetar a fertilidade, porém alguns deles podem ser compensados com o aumento na concentração espermática durante o processo de IA. Porém, alguns defeitos não são compensados com esse procedimento (MOCÉ & GRAHAM, 2008). Os valores obtidos dos cães avaliados foram aceitáveis. Segundo critérios do Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do CBRA- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). Os defeitos primários encontrados não passaram de 1%.

Tanto no sêmen fresco quanto no congelado foram baixos os defeitos encontrados, em média não passaram de 10% do total de células examinadas. Em dois animais, numa colheita apenas, esse número passou a aproximadamente 26%, porém foi um caso isolado, provavelmente causado pela manipulação do material (a maioria dos defeitos encontrados constituía-se de cauda enrolada).

Dentre os efeitos deletérios da criopreservação do sêmen, danos no acrossomo são os mais frequentes (MARTINS-BESSA et al., 2008). Para diminuir esses danos, vários diluentes foram testados, assim como a adição de substâncias como vitaminas, proteínas, que possuem efeito antioxidante. As membranas dos espermatozóides dos mamíferos são ricas em ácido graxos poli-insaturados, que são sensíveis às espécies reativas de oxigênio (ROS), que causa danos por peroxidação lipídica (SHEWEITA et al., 2005; MARTINS-

BESSA et al., 2008). Neste trabalho, o diluente utilizado foi o mesmo para todos os grupos de ração, ou seja, tentou-se avaliar o efeito da qualidade da ração na criopreservação do sêmen canino. Observou-se que existiu diferença entre as rações A (Econômica) e B (*Premium*), tendo a segunda menor quantidade de alterações morfológicas que a primeira. O outro tipo de ração (*Super premium*) não diferiu de A, nem de B. Pode-se sugerir um possível efeito dos componentes das rações interferindo na congelabilidade do sêmen. Apesar dessa diferença, a quantidade de defeitos encontrada foi pequena, sendo considerada dentro da normalidade, segundo o manual do CBRA (1998).

A avaliação ultrassonográfica de testículos e próstata foi compatível com as descrições da literatura. Possíveis alterações nos exames poderiam influenciar na qualidade do sêmen, o que não ocorreu. A próstata apresenta o parênquima com ecogenicidade variável, semelhante a do baço, aspecto difusamente grosseiro. O tamanho varia com a idade, raça, maturidade sexual e processos patológicos (CARVALHO, 2004). O exame ultrassonográfico também pode ser utilizado para aspiração direta em biópsia de lesões identificadas (FELDMAN & NELSON, 1996).

O exame dos testículos, tanto a avaliação ultrassonográfica quanto as medidas foram compatíveis com a idade dos animais, com exceção de um dos cães, ao exame, o testículo menor apresentava menor ecogenicidade comparado ao contralateral. Já nos outros cães, os testículos apresentaram parênquima homogêneo, com fina cápsula hiperecogênica (túnica albugínea) e uma estrutura linear delgada, hiperecogênica central, orientada longitudinalmente, chamada *mediastinum testis* (mediastino ou linha mediastinal) que é a extensão fibrosa da túnica albugínea (CARVALHO, 2004).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permite-se concluir que:

- 1- A análise da qualidade do sêmen fresco, de cães da raça Beagle, adultos, alimentados com três rações comerciais, não revelou diferença nos parâmetros avaliados, sugerindo que todas foram nutricionalmente completas e balanceadas
- 2- A análise do sêmen congelado, não foi diferente nos três tratamentos, nos parâmetros motilidade e movimento progressivo.
- 3- Animais alimentados com a ração *Premium* apresentaram menos defeitos de morfologia espermática do sêmen pós descongelamento, que a ração Econômica, porém não diferiu da ração *Super premium*.
- 4- Ao longo do tratamento, não foram observadas diferenças no exame ultrassonográfico de próstata e testículos, assim como suas medidas, permanecendo compatíveis com a idade dos cães.
- 5- Nos cães adultos utilizados neste experimento, tratados por cinco meses com cada ração, não existiu interferência positiva ou negativa da dieta na qualidade do sêmen.

7. REFERÊNCIAS¹

ANFAL Pet. Setor de Pet Food (alimentos para animais de companhia) teve crescimento negativo em 2008. Disponível em: <http://anfalpet.org.br/Site/principal.php?id_menu=6>, acesso, 17 de Dez de 2009.

BATEMAN, H.L. **Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival**. Guelph, 2001. 50p. Thesis (master). University of Guelph.

BROWN, B. W. A review of influences on reproduction in boars, bulls and rams. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 34, n.2, p.89-114, 1994

CARCIOFI, A. C. Alimentos industrializados para cães e gatos.. In: **Curso de Nutrição Básica com Enfoque Clínicos para cães e gatos**, São Paulo. Iº Ciclo de Educação Continuada em Medicina Veterinária, 2003. p. 22-32.

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

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R; SILVA, L. D. M.; CHIRINÉA, V. H.; SOUZA, F. F.; LOPES, M. D. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP106[®] using an In vitro sperm-oocyte interaction assay. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 42, p. 11-16, 2007.

¹ * Seguindo ABNT- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e Documentação, Referências, Elaboração: Rio de Janeiro, 2002, 24p.

CARVALHO, C.F. **Ultra-sonografia em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004, 384p.

CHIRINÉA, V. H. **Inseminação artificial com sêmen congelado em cães**. Botucatu, 85p., 2008. Tese de Doutorado- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CUNHA, I.C.N., LOPES, M.D., ZÚCCARI, 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. **Resumos**, Campo Grande, 1996. p.411.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1980, 446p.

DOTT, H.M., FOSTER, G.C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a different "live/dead" stain. **J. Reprod. Fertil.**, v.29, p.443-445, 1972.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 47, p.243-55, 1993.

ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v.37, p.373-81, 1992.

FELDMAN, E.D.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction.**, 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. 778p.

FERNANDES, T. P. **Características ultra-sonográficas em modo B (tempo real) da gestação da cabra doméstica (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758).** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP- São Paulo. 1996

FONTBONNE, A., BADINAND, F. Studies on freezing dog spermatozoa. Effect of glycerol on motility after thawing. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 47, p.531-32, 1993.

GUNZEL-APEL AR, GUNTHER C, TERHAER P, BADER H. Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. **J Reprod Fertil Suppl.** 47, p.271-278, 1993.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal.** São Paulo: Manole, 2003. 526p.

HERRERA, C., BROGLIATTI, G., CAVIA, R., CONDE, P., REVORA, M., PASQUALINI, R.S. CASA sperm parameters and their relation with in vitro fertilization. **In. Proc. 15th Int. Cong. Anim. Reprod. Brazil**, p.411, 2004.

HORI, T.; ODAKA, S.; OBA, H.; MIZUTANI, T.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 68, n. 10, p. 1055-1061, 2006.

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J. Validation of sperm quality analyser (SQA) for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.1143-58, 2001.

IVANOVA-KICHEVA, M.G.; BOBADOV, N.D.; SOMLEV, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, v.48, p.1343- 1349, 1997.

JANUSKAUSKAS, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm viability by measurements of ATP, membrane integrity and motility in frozen thawed bull semen. **Acta. Vet. Scan.** v. 36, p. 571 – 574, 1995.

JOHNSTON, S.D. Canine reproduction: lessons in reproductive biology. The 2000 Bartlett Address: A Monograph. Equine Symposium and Annual Conference Society for the Theriogenology. **Proceedings...**, San Antonio, p.2-8, 2000.

JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OSLON, P.N.S. Semen collection, evaluation and preservation. In: _____. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. cap.16, p.287-306.

LARSSON, B., EINARSSON, S. Influence of thawing diluents on vitality, acrosome morphology, ultraestructure and enzyme release of deep frozen boar spermatozoa. **Acta. Vet. Scan.**, v. 17, p. 83 – 100, 1976.

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. In: **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice. Canine Reproduction**. 1991, p. 467-85.

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. Fertil. Suppl.** 39, p.299- 310. 1989.

MARTINS, M. I. M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. Botucatu, 123p, 2005. Tese de Doutorado- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Effect of taurine and hypotaurine on post-thaw acrossome reaction of dog spermatozoa. **Theriogenology** (2008). doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.006.

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

NIZAŃSKI, W.; DUBIEL, A.; BIELAS, W.; DEJNEKA, G. J. Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 57, p.365-369, 2001.

OETTLÉ, E. E.; SOLEY, J.T. Infertility in a malttese poodle as a result of a sperm midpiece defect. **J. South Afr. Vet. Assoc.**, v.56, p.103-106, 1985.

OETTLÉ, E. E. Sperm mophology and fertility in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 47, p.257-60, 1993.

PAPA, F.O. BICUDO, S.D., ALVARENGA, M.A., RAMIRES, P.R.N., CARVALHO, I.M., LOPES, M.D. Coloração espermática segundo karras modificado pelo emprego do barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.40, n.2, p.115-23, 1988

PEÑA A, LINDE-FORSBERG C. Effect 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.

PEÑA A, LINDE-FORSBERG C. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**. v.59, n.8, p.1725-1739, 2003.

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

PECHMAN, R. D.; EILTS, B.E. B-mode ultrasonography of the bull testicle. **Theriogenology**. 27, n. 2, p. 431-441, 1987.

PLATZ, S. W.; SEAGER, C. C. Collection and evaluation of canine semen. **Vet. Clin. North. Am.**, v. 7, n4, p.765-773, 1977.

PLUMMER, J. M.; WATSON, P. F.; ALLEN, W. E. A spermatozoal midpiece abnormality associated with infertility in a Lhasa Apso dog. **J. Small Anim. Prac.** v.28, p.743-751, 1987.

QUINTERO-MORENO, A., MADRIGAL, O., GALLARDO, F., LOBO, V., MEDRANO, A., PEÑA, A., MIRÓ, J., RIGAU, T., RODRIGUEZ-GIL, J.E. Sperm subpopulation with specific motility characteristics in mammalian ejaculates. **In. Proc. 15th Int. Cong. Anim. Reprod. Brazil**, p.227, 2004.

RENTON, J.P.; HARVEY, M.J.A.; HARKER, S. A spermatozoal abnormality in dogs related to infertility. **Vet. Rec.** v.118, p.429-430, 1986.

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

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

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

ROTA, A., STROM, 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.1093-101, 1997.

ROTA A, PEÑA AI, LINDE-FORSBERG C, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlorthetracycline assay and changes in motility patterns. **Anim. Reprod. Sci.**, v.57, p.199-215, 1999.

ROTA A, ROTA A, MARTINI M, MILANI C, ROMAGNOLI S. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. **Reprod. Nutr. Dev.** v.45, n.1 p.29-37, 2005.

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

SEAGER, S.W.J. Artificial insemination in dogs. In: Burke, T.J. (Ed). **Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 207-217, 1986.

SEAGER, S.W.J., FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Lab. Anim. Sci.** v.22, p.177-182, 1972.

SHEWEITA, S. A.; TILMISANY,A. M.; AL-SAWAF,H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. **Curr. Drug. Metab.**, v. 6, n.5, p.495-501,2005.

SILVA,A. R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em TRIS: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos**.

Fortaleza, 2005. Tese de doutorado- Faculdade de Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará.

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

SILVA, L.D.M., ONCLIN, K., LEJEUNE, B., VERSTEGEN, J.P. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Vet. Rec.**, v.138, p.154-7, 1996.

SILVA, L.D.M. Avanços da inseminação artificial na espécie canina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.25, p.107-111, 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.

TSUTSUI, T., HASE, M., TANAKA, A., FUJIMURA, N., HORI, T., KAVAKAMI, 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.

VASKE, T. R., MORAES, H. F., ROMÃO, A.R., BLASI, A.C., PERASSI, P., AUN, G.C. Seis cães normais nascidos de sêmen congelado. **A Hora Veterinária**, v.1, p.15 – 18, 1981.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

WILLS, J., ROBINSON, I. O companheirismo do animal de estimação e sua evolução. **Unidos para sempre**. Ed. BEAZLEY, M. Octopus Publishing Group Ltda. p.10-23, 2000.

APÊNDICE

Tabela 8- Análise Hematológica média dos animais, dentro de cada grupo experimental, Jaboticabal/SP, 2009.

	Contagem Global		
	Ração A	Ração B	Ração C
He (cel/mm ³)	7220,0 ± 249,2 ^b	7484,2 ± 291,0 ^b	7341,1 ± 218,2 ^b
Leu (cel/mm ³)	11011,1 ± 249,2 ^a	8201,6 ± 1275,6 ^a	9944,4 ± 838,17 ^a
Hb (g/dL)	15,5 ± 0,3 ^b	16,1 ± 0,2 ^a	16,0 ± 0,5 ^{ab}
Ht (%)	45,8 ± 1,5 ^a	47,3 ± 1,4 ^a	46,4 ± 1,5 ^a
Plaquetas (cel/mm ³)	212500,0 ± 15417,1 ^a	223555,5 ± 14449,9 ^a	192000,0 ± 14950,8 ^a
	Contagem Diferencial		
	Ração A	Ração B	Ração C
Basófilos	0,4 ± 1,5 ^a	0,2 ± 0,2 ^a	0,4 ± 0,2 ^a
Eosinófilos	8,5 ± 0,9 ^b	6,2 ± 0,86 ^{ab}	4,3 ± 1,0 ^a
Neutrófilos Bast.	1,4 ± 0,8 ^{ab}	1,6 ± 0,6 ^{ab}	0,7 ± 0,3 ^b
Neutrófilos Seg.	62,3 ± 2,4 ^a	60,8 ± 2,5 ^a	63,2 ± 2,5 ^a
Linfócitos	25,2 ± 1,6 ^a	28,0 ± 2,2 ^a	28,8 ± 1,9 ^a
Monócitos	2,2 ± 0,4 ^a	2,2 ± 0,7 ^a	2,3 ± 0,40 ^a

Não houve diferenças estatísticas entre os grupos, todos se encontram dentro dos valores de normalidade para cães.

Tabela 9- Análise dos parâmetros bioquímicos médios, dentro de cada grupo experimental, Jaboticabal/SP, 2009.

	Ração A	Ração B	Ração C
ALT (U/dL)	29,6 ± 6,0 ^a	31,1 ± 4,0 ^a	48,1 ± 9,64 ^b
Creatinina (mg/dL)	0,95 ± 0,0 ^{ab}	0,90 ± 0,0 ^b	0,94 ± 0,0 ^{ab}
FA (U/L)	52,7 ± 8,4 ^a	53,2 ± 8,1 ^a	58,8 ± 8,6 ^a
PT (g/dL)	6,5 ± 0,1 ^b	6,6 ± 0,2 ^b	7,0 ± 0,3 ^{ab}
Albumina (g/dL)	3,0 ± 0,1 ^b	3,1 ± 0,0 ^b	3,2 ± 0,0 ^b
Uréia (mg/dL)	28,2 ± 4,3 ^b	38,7 ± 5,9 ^b	32,9 ± 3,2 ^b

* - Médias diferentes pelo teste T-Pareado (p<0,05).

Tabela 10- Análise média da urina dos animais, dentro de cada grupo experimental, Jaboticabal/SP, 2009.

Urinálise			
	Ração A	Ração B	Ração C
Densidade	1019 ± 0,0 ^b	1026 ± 0,0 ^{ab}	1,034 ± 0,0 ^c
pH	7,5 ± 0,3 ^b	7,0 ± 0,3 ^{ab}	5,7 ± 0,2 ^c
Sedimentoscopia			
Pt (mg/dL)	0,38±0,16 ^A	0,22±0,08 ^A	0,27±0,14 ^A
He ()	0,05±0,05 ^A	0,05±0,05 ^A	0,27±0,08 ^A
Leu ()	1,44±0,32 ^A	1,33±0,32 ^A	1,66±0,46 ^A
Cilindros	0,05±0,05 ^A	0,16±0,08 ^A	0,16±0,11 ^A
Granulosos			
Fosfato Triplo	1,55±0,81 ^A	1,27±0,65 ^A	0±0 ^A
Céls. Epiteliais de Transição	1,22±0,26 ^A	0,83±0,20 ^A	1,44±0,24 ^A

a,b – médias sem uma letra em comum na mesma linha são diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05)

A, B – médias sem uma letra em comum na mesma linha são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05)

Tabela 11- Idade dos cães da raça Beagle que compuseram o grupo experimental, Jaboticabal/SP, 2009.

Beagles (idades até 02/05/2008)		
Nome	Idade	Defeitos espermáticos totais (média %)
Piano	3A e 5 meses	5,2
Rancho	3A e 11 meses	3,3
Biscoito	4A e 5 meses	5,1
Bolero	4A e 5 meses	2,9
Tang	4A e 8 meses	6,5
Chapéu	4A e 8 meses	5,8
Chorão	6A e 5 meses	3,9
Billy	6A e 10 meses	4,2

Tabela 12- Componentes do diluente para o sêmen canino elaborado por ROTA et al. (1997) - ROTA A., STRÖM B., LINDE-FORSBERG C., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. Theriogenology 1997; 47: 1093-1101.

Componentes	Quantidade
TRIS	2,4 g
Ácido Cítrico.H ₂ O	1,4 g
Glicose	0,8 g
Glicerol	7 mL
Benzil penicilina	0,06 g
Sulfato de Estreptomicina	0,1 g
Gema de ovo	20 mL
Equex STM paste (Nova Chemical Sales, Scituate, Inc., MA, USA)	1 mL
Água Ultra-pura (Milli Q)	Completar para 100 mL

pH: 6,48

Osmolaridade: 1370 mOsm