

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL INTRAUTERINA EM FÊMEAS CANINAS POR
VIDEOLAPAROSCOPIA COM SÊMEN FRESCO E
DESCONGELADO

Aracéle Elisane Alves

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL- SÃO PAULO - BRASIL

Julho/ 2009

Alves, Aracéle Elisane

A474a Avaliação da técnica de inseminação artificial intrauterina em fêmeas caninas por videolaparoscopia com sêmen fresco e descongelado / Aracéle Elisane Alves. -- Jaboticabal, 2009
vii, 72 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente

Banca examinadora: Ana Paula Coelho Ribeiro, Maria Isabel de Mello Martins, Maria Denise Lopes, Paulo Henrique Franceschini.

Bibliografia

1. Cadela – Inseminação artificial intrauterina. 2. Cadela – videolaparoscopia. 3. Cadela - sêmen descongelado. I. Título. II. Jaboticabal- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.7:612.613

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação. Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ARACÉLLE ELISANE ALVES - Natural de Araxá - MG, nascida em 05 de abril de 1978, ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia- MG, em agosto de 1997, concluindo em julho de 2002. Em fevereiro de 2004 iniciou curso de mestrado em Cirurgia Veterinária na Universidade do Estado de São Paulo – Unesp, *campus* de Jaboticabal, concluindo-o em julho de 2005. Neste mesmo mês, ingressou no curso de Doutorado, pelo Programa de Pós Graduação em Cirurgia Veterinária, desta Universidade. Realizou doutorado sanduíche na “University of Bristol” – Bristol (UK), desenvolvendo internato em cirurgia de pequenos animais, sendo ainda membro do “Royal College Veterinary Surgeons” neste período, e então retornou ao Brasil concluindo o curso de doutorado em julho de 2009.

***Dedico este estudo
aos meus pais Paulo e Lourdes
e a minha eterna
e amada cadelinha Deby.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado, pela saúde e força.

Ao professor Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, pela orientação, confiança, apoio, incentivo e amizade e por me adotar como mais uma filha da Obstetrícia, muito obrigada por tudo.

Aos meus pais Paulo e Lourdes, por me transformar em tudo que sou hoje, por todo amor, confiança e sacrifícios, sem vocês eu não chegaria até aqui, obrigada.

Ao meu irmão Wellington por todo incentivo, carinho e amizade.

À minha amiga Karina Curi por cada vez mais me ensinar o verdadeiro significado da palavra amizade. Obrigada por tudo, por ser minha irmã e estar presente sempre que precisei durante todos esses anos, principalmente nas infinitas horas de apoio via internet à distância.

Ao meu querido Angelos Chrysopoulos; pelo amor, apoio e incentivo a continuar sempre em frente, superando as dificuldades e a saudade de todos.

Aos integrantes do que denominamos “Quarteto Fantástico” ...

- À Tathiana Fergus, meu “Chuchu”, obrigada por sua infinita ajuda, por compartilhar comigo as aventuras de desvendar Jaboticabal à procura dos proprietários de cadela em cio, coletas e processamento do sêmem, por ser minha “câmera girl”, dentre outros inumeráveis momentos de desespero você esteve sempre ao meu lado, obrigada!

- Ao meu amigo Giuliano Mostachio, por todo apoio, amizade e realização dos procedimentos de anestesia durante as inseminações.

- A minha amiga Maricy, ou minha Maericy nesses 4 anos de convivência no nosso cantinho. Acho que agora você já gosta de pão de queijo, Chiclete com banana... obrigada por estar presente em tantos momentos inesquecíveis, com certeza temos um bom livro de histórias, nacionais e internacionais à contar. Aproveito para agradecer também ao meu amigo pequeno, mas gigante de coração, Rodrigo Sacani pela amizade e carinho.

Juntos descobrimos o verdadeiro amor pela pesquisa e a capacidade de trabalho em grupo em harmonia, descobrimos que numa equipe não existe "Eu". Sem vocês não teria conseguido terminar esse trabalho, nunca vou me esquecer dos nossos preciosos momentos de trabalho, vocês foram essências, obrigada.

As minhas adoradas amigas, Ana Paula Coelho Ribeiro e Eliandra Pires pela orientação durante elaboração deste projeto, e todo apoio durante execução, e solidariedade na procura de cadelas em cio. Obrigada por me trazer a tranquilidade nos momentos de desespero!

À Carla Gadelha e Gabriela Covizzi pelo carinho e apoio.

Às residentes Fabiana e Michele pela paciência no recebimento de ligações dos proprietários, e aos amigos do departamento de Obstetrícia, envolvidos diretamente ou indiretamente com este trabalho, aos enfermeiros Anésia e Arnildo, à Dona Izilda... muito obrigada!!

Aos amigos do laboratório de Reprodução Animal, pela ajuda essencial no conhecimento do mundo biotecnológico.

À amiga Mabel de Freitas Cordeiro por compartilhar o desafio de aprender e realizar procedimentos por videolaparoscopia, obrigada pelo apoio, e amizade durante esses anos.

À amiga Nádia Delistoianov pelo carinho, amizade e por compartilhar os "apuros" da vida de pós-graduandas.

À amiga Paula di Filippo pelo companheirismo, apoio incondicional.

Às amigas Poliana, Maristela e Hilka pelo carinho, amizade e acolhimento na fase final desse trabalho.

Ao meu orientador durante “Doutorado Sanduíche” em Bristol, Alasdair Hotston Moore por toda amizade e confiança. Hoje acredito que é possível ser profissional e criança ao mesmo tempo! Obrigada por me acolher em seu grupo, por contribuir tanto para meu conhecimento cirúrgico e laparoscópico, e da língua estrangeira.

As enfermeiras Becky, Tracey, Rachel por todo carinho e amizade.

Aos meus amigos de hostel, são tantos mas em especial a Ilária, Backr e Sara. Impossível descrever aqui o que vocês significam pra mim, obrigada por fazer com que minha estadia em Langford fosse mais feliz, vocês são amigos pra toda vida.

Ao meu amigo Mike pelas análises estatísticas.

Aos proprietários dos animais que fizeram parte deste experimento, pela confiança em mim depositada e por acreditarem nos bons propósitos de nossas pesquisas.

Aos animais, sem os quais, nada seria realidade em minha vida profissional. Em especial as cadelas que participaram deste experimento e os doadores de sêmen: Robinho, Gordo, e em particular nosso querido Negão por tantos anos de contribuição a pesquisa.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para este estudo, meus agradecimentos.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1.1 Escolha do animal e Coleta seminal.....	01
1.2 Análise do sêmen.....	03
1.3 Processamento do sêmen.....	07
1.4 Monitoramento do ciclo estral da cadela	09
1.5 Inseminação artificial	09
1.6 Vias de inseminação artificial	10
1.7 Inseminação artificial utilizando sêmen congelado	12
1.8 Inseminação artificial utilizando sêmen fresco.....	12
1.9 Coloração de embriões.....	12
CAPITULO 2: AVALIAÇÃO DE TRÊS DIFERENTES DILUENTES E PROTOCOLOS PARA A CONGELAÇÃO DE SÊMEN A BASE DE TRIS.	
RESUMO.....	13
SUMMARY.....	15
I. INTRODUÇÃO.....	16
II. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.1.2 Objetivos específicos.....	16
2.2 Hipótese.....	17
III. MATERIAL E MÉTODO....	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Coleta e análise do sêmen.....	18
3.3 Análise dos ejaculados.....	18
3.4 Processo de Congelação do Sêmen.....	20
3.4.1 Protocolo 1 (TRIS + GLICEROL)	20
3.4.2 Protocolo 2 (TRIS - ÁCIDO CÍTRICO - GLI 7% - OEP MODIFICADO).....	21
3.4.3 Protocolo 3 (TRIS +GLICEROL 8%).....	22
3.4.4 ANALISE ESTATISTICA.....	23
IV. RESULTADOS	24
V. DISCUSSÃO.....	30

V. CONCLUSÃO	33
VI. REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO 3: INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRAUTERINA COM SÊMEN FRESCO E CONGELADO POR VIDEOLAPAROSCOPIA EM CADELAS.	
RESUMO.....	33
SUMMARY.....	34
I. INTRODUÇÃO	35
II. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.1.2 Objetivos específicos.....	16
2.2 Hipótese.....	17
III. MATERIAL E MÉTODO.....	44
3.1 Animais.....	44
3.2 Citologia vaginal e dosagens de progesterona	44
3.3 Processamento do sêmen	45
3.3.1 Preparação do sêmen fresco.....	45
3.3.2 Preparação do sêmen congelado	45
3.4 Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia.....	46
3.4.1 Medicação Pré-Anestésica (MPA).....	46
3.4.2 Indução e Manutenção.....	46
3.4.3 Procedimento cirúrgico.....	47
3.4.4 Verificação da taxa de fecundação.....	47
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
IV. RESULTADOS.....	51
4.1 Resultados obtidos após inseminações utilizando sêmen fresco... 	51
4.2 Resultados obtidos após inseminações utilizando sêmen descongelado.....	55
V. DISCUSSÃO.....	59
VI. CONCLUSÃO.....	64
VII. REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS.....	71

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1: Curva de congelação do sêmen canino utilizada durante este realização do protocolo 2. Jaboticabal 2009.....22

Tabela 2: Tabela 2: Parâmetros seminais caninos determinados imediatamente após coleta (n=9) (Média \pm Desvios Padrão; p <0,05), FCAV-Unesp Jaboticabal, 2009.....24

Tabela 3: Avaliação da motilidade espermática nas amostras de sêmen canino; antes, no momento da descongelação e após 15 e 30 minutos de descongelação de acordo com os procolos 1, 2 e 3. Jaboticabal, 2009.....25

Tabela 4: Vigor espermático nas amostras de sêmen canino; antes, no momento da descongelação e após 15 e 30 minutos de descongelação de acordo com os protocolos 1, 2 e 3. Jaboticabal, 2009.....27

Tabela 5: Porcentagem de espermatozoídes vivos nas amostras de sêmen canino; antes, no momento da descongelação e após 15 e 30 minutos de descongelação de acordo com os protocolos 1, 2 e 3. Jaboticabal, 2009.....28

Tabela 6: Valores médios obtidos durante análises de morfologia espermática nas amostras de sêmen canino a fresco e após processo de descongelação. Jaboticabal, 2009.....29

Capítulo III

Tabela 1: Idade, concentrações séricas de progesterona, suposto dia de Ovulação e IA, nas cadelas e número de embriões encontrados nas cadelas submetidas a inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia utilizando sêmen fresco. FCAV-Unesp Jaboticabal – 2009.....51

Tabela 2: Número de corpos lúteos e embriões; localização e qualidade embrionária, localização e quantidade oocitária após análise do lavado de tubas e cornos uterinos, de cadelas, 7 dias após inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia com sêmen fresco. FCAV-Unesp Jaboticabal – 2009.....53

Tabela 3: Idade, concentrações séricas de progesterona, suposto dia de Ovulação e IA, nas cadelas e número de embriões encontrados nas cadelas submetidas a inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia utilizando sêmen descongelado. FCAV-Unesp / Jaboticabal – 2009.....55

Tabela 4: Número de corpos lúteos e embriões; localização e qualidade embrionária, localização e quantidade oocitária após análise do lavado de

tubas e cornos uterinos, de cadelas, 7 dias após inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia utilizando sêmen descongelado. FCAV-Unesp Jaboticabal – 2009.....57

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 01: Coleta de sêmen por manipulação digital. Jaboticabal-2009.....19

Figura 02: Amostra seminal em tubo plástico graduado durante avaliação de coloração e volume.....19

Figura 03: Amostras espermáticas envasadas, em refrigerador a temperatura de 5°C. Jaboticabal-2007.....21

Figura 04: Valores obtidos de motilidade espermática durante descongelamento de acordo com momentos de análise das amostras submetidas aos 3 diferentes protocolos de congelação, sendo Prot.1: Protocolo 1; Prot.2: Protocolo 2; Prot. 3: Protocolo 3.....26

Figura 05: Valores obtidos de vigor espermático durante descongelamento de acordo com momentos de análise das amostras submetidas aos 3 diferentes protocolos de congelação, sendo Prot.1: Protocolo 1; Prot.2: Protocolo 2; Prot. 3: Protocolo 3.....26

Capítulo III

Figura 01: A: Instalação do pneumoperitônio, sob inserção da agulha de Veres (1). B: Trocarte, endoscópio e fonte de luz (2) e cânula de CO₂ (3); Trocartes com pinças de manipulação (4); C: Localização do terço cranial do corno uterino e fixação utilizando pinça de manipulação; D: Posicionamento do corno uterino e inserção do catéter pela parede abdominal; E: Imagem interna do catéter inserido no lúmen uterino e injeção da amostra do sêmen; F: Imagem externa da inserção do catéter na parede abdominal, sendo este acoplado a seringa contendo amostra do sêmen. FCAV – Jaboticabal 2009.....48

Figura 02: Embriões e oócitos encontrados no lavado de tubas uterinas após 7 dias de inseminação intrauterina utilizando sêmen fresco. A: 1-embriões normais; 2- embrião degenerado; B: embrião com 3 células; C: embrião com 4 células; D: Oócitos encontrados no lavado de tubas uterinas.....54

Figura 03: Coloração Hoescht em embrião com mais de 4 células no lavado de tubas uterinas após 7 dias de inseminação intrauterina utilizando sêmen fresco.54

Figura 04: Embrião e oócitos encontrados no lavado de tubas uterinas após 7 dias de inseminação intrauterina utilizando semen descongelado. A: Embrião de 3 células (Coloração com iodeto de propídio); B: Embrião de 2 células; C: Embrião de 4 células; D: Embrião com mais de 4 células; E: oócitos não fecundados; F: Coloração Hoescht em embrião com mais de 4 células. FCAV- Jaboticabal (2009).....58

LISTA DE ABREVIATURAS

P4: progesterona

MII: Metáfase II

IAIV: Inseminação artificial intravaginal

IAIU: Inseminação artificial intrauterina

TRIS: Tris-hidroximetil-aminometano

BSA: Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Escolha do animal e coleta do sêmen

A seleção de reprodutores deve ser feita por meio de anamnese detalhada, verificando-se o desempenho reprodutivo do macho e histórico do animal, exame clínico geral, andrológico além de testes de sorologia para doenças infecto contagiosas. Assim, segue-se à coleta e avaliação do sêmen e inspeção do comportamento de monta (lívido), podendo ter continuidade com testes hormonais e análises cromossômicas (CHRISTIANSEN, 1988; FELDMAN e NELSON, 1996).

Diversos métodos são utilizados na coleta do sêmen nesta espécie, tais como: massagem digital, uso de vagina artificial, vibrador elétrico e eletroejaculação (HARROP, 1955; CHRISTIANSEN, 1988). Segundo Boucher et al., (1958), massagem digital permite a obtenção de sêmen de qualidade superior aos outros métodos. A coleta de sêmen pode ser facilitada realizada em cães na presença de cadela em estro, particularmente no caso de cães inexperientes.

A coleta digital consiste em massagear o prepúcio do cão na altura do bulbo cavernoso, até que o animal atinja a ereção parcial. O prepúcio é então retraído até o bulbo do pênis que deve ser levemente pressionado (SEAGER e FLETCHER, 1972; CHRISTIANSEN, 1988).

1.2 Análise do sêmen

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

O ejaculado canino é naturalmente dividido em três frações distintas (HARROP, 1955). A primeira fração consiste em um fluido claro originado na próstata e supõe-se ser responsável pela limpeza do canal uretral (ENGLAND e ALLEN, 1992). A segunda fração tem origem do epidídimo, é rica em espermatozóides, tem volume variável, com aspecto turvo, leitoso e opalescente (CHRISTIANSEN, 1988). A terceira fração é também fluido prostático, claro e facilmente distinguível da fração espermática,

apresentando grande volume e serve como diluente natural (ENGLAND e ALLEN, 1992).

A motilidade espermática consiste na determinação da porcentagem de espermatozóides móveis na amostra avaliada imediatamente após a coleta ou após a descongelação do sêmen (SEAGER e FLETCHER, 1972). O estudo da motilidade após a criopreservação tem como objetivo verificar a proporção de espermatozóides que mantiveram a motilidade após possíveis injúrias causadas pelo processo (PEÑA, 2000). A proporção de espermatozóides exibindo motilidade progressiva é estimada, subjetivamente, no microscópio óptico de contraste de fase ou, de forma objetiva, utilizando-se a análise computadorizada (PEÑA MARTINEZ, 2004).

O vigor espermático define-se como a qualidade do movimento exibido pelos espermatozóides móveis. Para tanto, faz-se uso de uma escala compreendida numa faixa de 0 a 5, onde (0) Todos os espermatozóides sem movimento, (1) Movimentos lentos látero-laterais, sem progressão, (2) Rápidos movimentos látero-laterais, sem progressão, (3) Rápidos movimentos látero-laterais, com ocasional progressão, (4) Lenta e contínua progressão, (5) Rápida e contínua progressão. Tal classificação pode variar segundo os autores; Platz e Seager (1977); Christiansen (1988) e Johnston et al., (2001).

A morfologia espermática é um importante parâmetro ligado a problemas de fertilidade. Dentre os métodos desenvolvidos para avaliar a morfologia da célula espermática, são confeccionados esfregaços úmidos de sêmen a serem examinados por microscopia de contraste de fase após a fixação com glutaraldeído ou tampão salina formolizada afim de manter as características celulares para futura observação. Outros métodos incluem o uso de corantes Wright, Rosa de Bengala (STRÖM et al., 1997), Giemsa (CARDOSO et al., 2003), Hematoxilina-eosina (SILVA et al., 2003a) e eosina-nigrosina (PEÑA, 2000). Existem dois principais métodos de classificação das alterações morfológicas. Um deles é dividido em alterações primárias e secundárias (JOHNSTON et al., 2001), e o segundo em defeitos maiores e menores (OETTLÉ, 1993). Segundo Cardoso (2007), uma outra classificação pode dividir os defeitos maiores e menores quanto à região do espermatozóide em que está situada a

alteração, ou seja, cabeça, peça intermediária e cauda (CARDOSO et al., 2003) os defeitos maiores são aqueles que podem ter um efeito negativo maior na fertilidade, diferentemente dos menores (OETTLÉ e SOLEY, 1988). Oettlé (1993) descreve a união dessas duas últimas categorias, na qual são em cada região da célula espermática.

Uma amostra de sêmen de boa qualidade, deve exibir motilidade mínima de 70% (CHRISTIANSEN, 1988). O vigor espermático (qualidade da motilidade exibida pelos espermatozóides) deve ser no mínimo 3, observada em escala que varia de 0 a 5 (PLATZ e SEAGER, 1977). Oettlé (1993) demonstrou que a morfologia espermática normal em cães estaria melhor correlacionada com a fertilidade após inseminação artificial (IA), do que a simples observação da motilidade espermática, além disso observou que à medida que se aumenta o percentual de espermatozóides anormais, a fertilidade é reduzida, sendo observado que, quando a proporção de espermatozóides morfológicamente normais estava abaixo de 60%, a fertilidade foi adversamente afetada.

1.3 Processamento do sêmen

De acordo com Cardoso et al., (2003), o conceito de preservação da célula espermática, inequivocadamente, implica a preservação de sua capacidade funcional, isto é, a habilidade para produzir descendentes, o que, necessariamente, envolve a manutenção da integridade celular espermática, a habilidade em penetrar o oócito e a competência para suportar o desenvolvimento embrionário.

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

O sêmen congelado oferece maior flexibilidade de uso, porém com mudanças mais drásticas quanto à sua qualidade pós-descongelamento, entretanto pode não permanecer fecundante quando utilizado em IA (CONCANNON e BATTISTA, 1989).

Com relação a IA utilizando sêmen congelado, England (1993), descreve que foi SPALLANZANI, em 1776, o primeiro a relatar que a atividade metabólica dos espermatozoides era reduzida com a diminuição da temperatura. Desde o descobrimento do glicerol por POLGE et al., em 1949, vários estudos foram realizados, mas o sucesso na criopreservação da célula espermática na espécie canina, só ocorreu em 1954 por ROWSON. Sendo que a primeira gestação numa cadela, a partir da IA com sêmen congelado foi relatada por SEAGER (1969). Desde então, pesquisas vem sendo desenvolvidas com o intuito de se encontrar os componentes ideais para o máximo de preservação da célula espermática após congelamento.

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

A composição dos diluentes utilizados geralmente incluem: crioprotetores (glicerol, etilenoglicol e outros), nutrientes e tampões.

Assim, durante o processo de criopreservação do sêmen canino é relatado o uso de diluentes tais como a lactose (SEAGER, 1969); o Triladyl (NOTHLING et al., 1995), o Biociphos W482 e o Laiciphos 478 (SILVA & VERSTEGEN, 1995); o leite desnatado e a glicina-gema (CUNHA e LOPES, 1997), o Tris (UCHOA et al., 2001), o Tris-gema (STORNELLI et al., 2001), a água de coco (CARDOSO et al, 2003), e o leite desnatado (YASUYUKI ABE et al ., 2008).

Melhores resultados de motilidade espermática tem sido obtidos utilizando TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano) usado como tampão para neutralizar o pH ácido do meio diluente, e por possuir osmolaridade e concentração de eletrólitos fisiológicas, como descrito por SANTOS et al., (1999) e SILVA et al., (2003a). Acredita-se que o TRIS, também atue como substrato energético para as células espermáticas. Iguer-Ouada (2001) obteve êxito ao prolongar a viabilidade do sêmen canino por mais de 20 dias utilizando TRIS. A gema de ovo de galinha é adicionada ao Tris, geralmente na

proporção de 20% (SILVA et al., 2003b), por promover a proteção da célula espermática contra o choque térmico (HAMMERSTEDT et al., 1990).

O sucesso da criopreservação do sêmen canino é afetado por muitas variáveis, e o potencial tóxico do agente crioprotetor particularmente em referência a concentração, tempo e temperatura que o sêmen é exposto ao crioprotetor.

Os crioprotetores tem a finalidade de reduzir os danos aos espermatozóides resultantes da congelação e descongelação. Dentre os agentes crioprotetores destacam-se o glicerol (POLGE et al., 1949), o dimetilsulfóxido (OLAR et al., 1989), o metanol (KIM et al., 1994) e o etileno-glicol (BESSA, et al., 2006). Os crioprotetores, causam inicialmente desidratação da célula por induzir a saída de água (WATSON, 1995), reduzindo as injúrias da criopreservação. O glicerol é o crioprotetor mais empregado na congelação de sêmen canino em concentrações variando entre 2 e 8%, dependendo da composição do diluente utilizado (RAVASZOVA et al., 1996). Os métodos de congelação preconizam minimizar o dano causado ao espermatozóide durante o processamento, variando diluentes e agentes crioprotetores, e diferentes velocidades de congelação (STRÖM et al., 1997).

Antibióticos como penicilina, estreptomicina, neomicina; tem sido utilizados para prevenir a contaminação microbiana, que pode afetar a fertilidade, devido à presença de bactérias e toxinas geradas pela degradação dos componentes de origem biológica do meio ou pela utilização de alguns substratos metabólicos (WATSON, 1990).

Martins (2005) cita a adição de detergentes, como o SDS (dodecil sulfato de sódio) como um dos componentes do Equex STM Paste (PONGLOWHAPAN & CHATDARONG, 2008) e Orvus es Paste (TSUTSUI et al., 2000) no meio diluente esses favorecem a ação dos fosfolipídeos da gema de ovo e aumentando a proteção do espermatozóide contra o choque térmico (PEÑA et al., 2003).

Também tem sido incluídos na composição dos diluentes, nutrientes como uma fonte de energia para o metabolismo espermático (glicose, frutose, lactose).

WEISS et al., (2000) congelaram sêmen canino diluído em meio Tris-glicose-gema adicionado de 0,4% de Equex, com duas horas de equilíbrio a 5°C e obtiveram 65% de motilidade progressiva e integridade acrossomal após descongelação.

SILVA et al., (2003a) avaliaram a qualidade do sêmen após processo de congelação realizando a adição de glicerol em um só momento ou fracionada, não obtendo diferença significativa entre os processos.

OLIVEIRA et al., (1999) compararam diluente lactose-gema com Tris-gema e testaram o tempo de equilíbrio em 1, 2, 3 e 4 horas a 5°C e concluíram que não houve diferença estatística entre os diluentes e tempos de equilíbrio em relação as percentagens de motilidade e vigor no sêmen descongelado.

ROTA et al., (1999) congelaram sêmen canino utilizando diluente Tris-glicose citrato acrescido ou não de 0,5% de “Equex STM Paste” com bons resultados na descongelação no que se refere a motilidade e vigor. Após inseminações intrauterina e vaginal, obtiveram as seguintes proporções de gestações em relação ao número de cadelas inseminadas, 4 de 5 e 3 de 5 respectivamente, e não observaram diferença em relação a presença ou não do Equex.

SILVA et al., (2006) compararam a influência da temperatura ambiente durante a adição de glicerol as amostras de sêmen canino. A adição foi realizada a 27 °C e 4 °C, sendo que não foram observadas diferenças entre as amostras seminais de acordo com os parâmetros analisados.

SILVA et al., (2006) avaliaram também a água de côco em pó reconstituída em TRIS como diluentes na criopreservação do sêmen canino; em ambos os grupos a gema de ovo foi utilizada na proporção de 20%, e glicerol 6%. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois diluentes no decorrer dos procedimentos de criopreservação e descongelação e estes foram eficientes em conservar 50% dos espermatozoides móveis e 70% dos espermatozoides morfologicamente normais após descongelação.

SANTOS (2004) avaliou o perfil “*in vitro*” e “*in vivo*” do sêmen canino congelado com diluente TRIS-BSA (albumina sérica bovina) e Tris-Gema, sendo que Tris-Gema apresentou melhores resultados em motilidade, vigor (após 2 horas de descongelação no teste de termoresistência), integridade acrossomal, índices de prenhez e número de filhotes.

MARTINS (2005), avaliou os efeitos das modificações ambientais sobre a função

testicular, realizando as coletas de sêmen quinzenalmente e avaliando imediatamente após coleta quanto à motilidade e vigor espermático, pH, concentração e morfologia dos espermatozoides. Os resultados na descongelação não variaram no decorrer do período. Diante desses resultados, conclui-se que em regiões tropicais a sazonalidade apresenta uma pequena interferência na função testicular dos cães.

1.4 Monitoramento do ciclo estral da cadela

O sucesso da IA em cães, está diretamente ligado às dificuldades na determinação do momento ideal da realização da cópula já que a espécie canina possui fisiologia reprodutiva particular. Para a realização da IA, sugere-se a observação das mudanças anatômicas e comportamentais da cadela. O proestro caracteriza-se por edemaciação vulvar, associada a uma descarga serosanguinolenta vaginal, devido às altas concentrações de estrógeno, atração dos machos, mas não permite a cópula (JOHNSTON et al., 2001). Nesta fase os concentrações séricas de progesterona aumentam de 0,5 ng/mL (anestro) para 1 ng/mL, 24 a 48 horas antes da onda pré-ovulatória de LH, alcançando concentrações de 2 à 4 ng/mL de progesterona por ocasião da onda de LH, e a ovulação inicia 2 dias mais tarde, quando a concentração de progesterona é de 4 à 10 ng/mL. A progesterona é secretada antes do desenvolvimento dos corpos lúteos (FELDMAN e NELSON, 1996).

A próxima fase denominada estro, caracteriza-se pela vulva aumentada, diminuição das descargas vaginais e aceitação do acasalamento (ALLEN, 1992). No início dessa fase, o estrógeno atinge concentrações máximos, iniciando seu declínio em seguida. Esse pico de estrógeno promove o pico de LH, que por sua vez é responsável pelo desencadear da ovulação (CONCANNON et al., 1989).

Segundo Concannon et al., (1977) a ovulação ocorre entre 36 e 50 horas após o pico de hormônio luteinizante (LH). Os ovócitos liberados não estariam ainda maduros, encontrando-se no estado de vesícula germinativa. A maturação seria então concluída depois de dois a três dias com a emissão do segundo corpúsculo polar (HOLST e PHEMISTER, 1971; TSUTSUI, 1989). A partir desse momento o ovócito estaria pronto para a maturação, com sobrevivência de apenas 24 a 48 horas (CONCANNON e

BATTISTA, 1989). O limite máximo de fecundação se encontraria em torno de 6,5 dias depois do pico de LH (TSUTSUI, 1989).

O momento da inseminação é fator importante independentemente do uso de sêmen congelado ou fresco. Na utilização do sêmen fresco a primeira inseminação deve ser realizada o mais próximo possível da maturação dos oócitos, que na maioria das cadelas ocorre a partir do quarto dia após o pico de LH (dia 0), quando os concentrações de progesterona atingem entre 10 à 13 ng/mL, e a segunda inseminação, quando os valores atingem entre 18 a 25 ng/mL, usualmente 24 a 36 horas mais tarde. Estes fatores são determinantes para o sucesso da inseminação artificial em cadelas com sêmen criopreservado (ENGLAND e LOFSTED, 2000).

A citologia vaginal revela mudanças características de acordo com as fases do ciclo éstrico (SCHUTTE, 1967). Quando a fêmea apresentar 70% de células epiteliais superficiais e estiver receptiva ao macho poderá ser inseminada (SILVA et al., 2002b).

Outra alternativa para a verificação da fase do ciclo estral na cadela é a utilização da vaginoscopia (LINDSAY, 1983). Nesse método, o momento ideal para a realização da IA seria quando a mucosa vaginal apresentar pregas fortemente angulosas e de coloração pálida (JOHNSTON et al., 2001).

O método mais eficiente para se determinar o momento ótimo para a IA é por meio da dosagem de progesterona plasmática, uma vez que a cadela é a única dentre as fêmeas domésticas que apresenta aumento de progesterona dois a três dias antes da ovulação (JOHNSTON et al., 2001). Os valores de progesterona sérica são inferiores a 1,0 ng/mL durante o anestro e a maior parte do proestro e rapidamente começam a aumentar próximo ao pico de LH (CONCANNON et al., 1989). Segundo Johnston et al., (2001), o momento ideal para a realização da IA seria dois dias após a progesterona ter atingido concentrações entre 4 e 10 ng/mL. Dosagens paralelas de progesterona e hormônio luteinizante (LH) mostraram que o início da elevação significativa da progesterona corresponde ao pico do LH, o qual pode ser uma referência importante para definir-se as datas da inseminação, uma vez que a ovulação costuma ocorrer 48 horas após o pico desse hormônio (GUÉRIN, 1998).

A dosagem da progesterona pode ser feita com auxílio de kits semiquantitativos

comerciais do Enzyme Linked Imunosorbent Assay (ELISA) ou por laboratórios especializados que fornecem valores quantitativos obtidos por radioimunoensaio (RIA).

1.5 Histórico da Inseminação artificial (IA)

A primeira IA em cães relatada cientificamente foi realizada em 1780 pelo monge italiano Lazzaro Spallanzani que inseminou com auxílio de uma seringa uma cadela de raça Bardoni com dezenove grãos de esperma (1 grão=50mg) colhido de um cão da mesma raça e como conseqüência, 62 dias após, nasceram 3 filhotes saudáveis com características da referida raça (JOHNSTON et al., 2001). Em 1914, Giuseppe Amantea, um fisiologista italiano, construiu a primeira vagina artificial, adaptável ao cão visando estudos sobre o sêmen (MIES FILHO, 1987).

Harrop em 1954 realizou a primeira IA com sêmen de cães refrigerado a 4 °C. Após 15 anos, Seager (1969) obteve a primeira gestação utilizando amostras de sêmen canino congelado, resultando no nascimento de dois filhotes, prosseguindo nos anos 80 com resultados se aproximando aos obtidos por monta natural.

1.6 Vias de inseminação artificial

A inseminação artificial intravaginal (IAIV), é amplamente utilizada por ser de fácil execução e oferecer bons resultados. Para esta técnica pode-se utilizar pipetas rígidas de vidro ou plástica (SEAGER e PLATZ,1977) ou a sonda de Osiris (MIALOT et al., 1985). No protocolo clássico de inseminação intravaginal, recomenda-se a elevação do membros posteriores da cadela por 5 a 20 minutos, visando-se evitar o refluxo do sêmen (SEAGER, 1986).

A inseminação artificial intrauterina (IAIU), pode ser utilizada em casos onde a via vaginal poderia comprometer os resultados da IA, como, por exemplo, na utilização de um sêmen congelado com baixa qualidade pós-descongelamento (SILVA et al., 1995a). Segundo Johnston et al., (2001), a IAIU pode ainda ser utilizada como uma alternativa para melhorar as taxas de fertilidade de machos oligospermicos. A IAIU pode ser feita por via transcervical, ou por meio de procedimentos cirúrgicos transabdominais

como a laparotomia e laparoscopia. A IAIU por laparotomia tenta superar as dificuldades da inseminação transcervical. A IAIU por laparoscopia, apesar de ser uma técnica cirúrgica, é pouco invasiva, de rápida execução, necessitando de menor tempo de anestesia, pois esta em longa prazo pode interferir na motilidade uterina e na migração oocitária (TSUTSUI et al., 1989).

Os resultados obtidos com esta técnica, tanto com sêmen fresco ou congelado, têm sido satisfatórios (SILVA et al., 1995b). Boas taxas de fertilidade já foram obtidas com doses inseminantes de 35×10^6 espermatozóides móveis após IAIU e de 50×10^6 espermatozóides móveis após IAIV (WILSON, 1993).

Segundo Wilson (1993), esse método proporcionaria taxas de concepção em torno de 80%, mesmo com a utilização do sêmen congelado.

1.7 Inseminação artificial utilizando sêmen congelado

O sucesso da inseminação com sêmen congelado é dependente do local de deposição e do momento de ovulação (JEFFCOATE e LINDSAY, 1989). Os melhores resultados de fertilidade utilizando sêmen congelado são obtidos quando é realizada inseminação intrauterina (LINDE FORSBERG, 1991). No uso do sêmen refrigerado, Pinto et al., (1999) obtiveram 90% e 100% de fertilidade em cadelas submetidas à IAIV com sêmen refrigerado por 24 e 48 horas, respectivamente. Mas, segundo Guérin (1998), os resultados são geralmente inferiores àqueles obtidos com o sêmen fresco, sendo obtida uma taxa de fertilidade em torno de 70%.

Cremonesi et al., (2005) realizaram uma única inseminação transcervical por endoscopia utilizando sêmen congelado. As amostras de sêmen continham 50-95% de espermatozóides móveis, motilidade progressiva 4-5 (0 - sem motilidade; 5 - motilidade máxima), e anomalias espermáticas menores que 30%. O volume da dose variou de 1,5 à 3 mL até que a concentração atingisse 100 milhões de espermatozóides por palheta após a descongelação. A monitoração do ciclo estral foi feita a partir do quinto dia de proestro, por meio de citologia vaginal e dosagens de progesterona. As inseminações foram realizadas quando a citologia vaginal mostrava 90% de células cornificadas, e 48 horas após os concentrações plasmáticos de progesterona atingirem valores acima de

6,5 ng/mL. A canulação intrauterina foi realizada utilizando endoscópio rígido, após sedação do animal. Os autores obtiveram 71% de prenhez, sendo o número médio de filhotes 5,5.

Silva et al., (1995a) realizaram inseminação intrauterina por videolaparoscopia em cadelas, com dois procedimentos nos dias 3 e 5 após estimado o pico de LH, utilizando sêmen congelado em três extensores diferentes (Laiciphos, Tes/Tris e Biociphos). As fêmeas foram inseminadas com 1,0 mL de sêmen com 200×10^6 espermatozoides/mL diluídos em 1mL de extensor. A taxa de gestação foi de 60% nos animais inseminados com sêmen contendo Laiciphos e Tes/Tris, e 100% nas cadelas inseminadas com sêmen extendido com Biociphos. Fêmeas inseminadas com Laiciphos, Tes/Tris e Biociphos tiveram ninhadas com $5 \pm 2,6$; $3,0 \pm 1,0$ e $3,4 \pm 1,3$ filhotes, respectivamente.

Thomassen et al., (2006) realizaram um levantamento das inseminações artificiais realizadas no período de 1994 à 2003. As inseminações foram feitas em 685 cadelas, utilizando sêmen congelado em fêmeas em estro natural, pequeno, médio, e grande portes. O tempo de ovulação foi baseado na avaliação clínica e laboratorial, incluindo secreção vaginal, e concentrações de progesterona. Duas inseminações foram feitas, 2° e 3° dias após estimada ovulação.

Após coleta por manipulação digital, as amostras seminais foram avaliadas quanto a motilidade e anomalias espermáticas, e diluída em Tris-frutose-ácido cítrico (35-37°C), contendo 8% de glicerol e 20% de gema de ovo, alcançando uma concentração de $1,0 \times 10^8$ espermatozoides/mL. Seguido o processo de congelamento, novas avaliações foram realizadas após descongelamento, e um volume de 2-2,5 mL da amostra foi utilizado. O procedimento de inseminação foi feito utilizando catéter transcervical, sendo inseminação intrauterina em 665 e intravaginal em 20 cadelas. A taxa de prenhez foi de 73,1% e a média do número de filhotes foi $5,7 \pm 0,1$. Houve 75% de concepção nos animais provenientes de inseminação intrauterina, somente 10% nas fêmeas de inseminação intravaginal.

Fontbonne & Badinand (1993), encontraram taxa de fertilidade de 52,6% a partir de IAIV com a sonda de Osíris e 73,6% em IAIU transcervical por cateterismo, não

sendo evidenciadas diferenças estatísticas entre os dois métodos.

1.8 Inseminação artificial utilizando sêmen fresco

A IA com sêmen canino fresco, proporciona resultados de fertilidade similares àqueles obtidos pela monta natural (PEREIRA et al., 2001), a qual, segundo Daurio et al., (1987), apresenta eficiência em torno de 85% nesta espécie.

Silva et al., (1995b) avaliaram inseminação intrauterina por laparoscopia em cadelas em cio natural utilizando sêmen fresco e outro grupo com monta natural. Duas inseminações foram realizadas com 48 horas de intervalo nos dias 3 e 5 ou 4 e 6, após aumento de progesterona plasmática considerada indicativo de pré-ovulação e pico de LH. A inseminação por laparoscopia foi realizada utilizando fórceps para fixação do útero e catéter 18G para deposição do 1mL de sêmen fresco (250 à 480×10^6 espermatozóides /mL) no lúmen uterino. Todas as inseminações resultaram em gestação, o tamanho da ninhada foi similar nos animais inseminados e de monta natural ($5 \pm 1,8$ e $4 \pm 1,6$ filhotes/fêmea respectivamente). O tempo de gestação nos animais inseminados foi $65,2 \pm 0,8$ dias e monta natural $65,4 \pm 0,5$ após o pico de LH.

Tsutsui et al., (2003) realizaram inseminação intratubária em cadelas utilizando sêmen fresco em diferentes concentrações ($0,5 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$, $4,0 \times 10^6$ espermatozóides em cada tuba uterina. O período de ovulação foi determinado por mensurações de P4, considerando o dia da ovulação quando os concentrações se encontravam em 2 ng/mL. As fêmeas foram inseminadas 3 - 5 dias após a ovulação, por laparotomia, depositando o sêmen na ampola tubárica. Nenhuma concepção foi verificada nos animais inseminados com $0,5 \times 10^6$, entretanto a concepção ocorreu em 75% e 37,5% das fêmeas inseminadas com $2,0 \times 10^6$, $4,0 \times 10^6$ espermatozóides, respectivamente.

1.9 Coloração dos embriões

O corante *Hoescht* cora o DNA nuclear e tem sido largamente empregado em citologia com a finalidade de corar cromossomos. Com a utilização desse corante,

avalia-se também a integridade da membrana celular (Saha *et al.*, 2000) e dos componentes nucleares (Jewgenow, 1998).

O iodeto de propídio também é um agente que penetra na molécula de DNA (corante de ácidos nucléicos) e emite uma fluorescência amarela e vermelha. O iodeto de propídio não penetra na membrana de células viáveis. A exclusão do iodeto de propídio é assim um método eficiente para detecção da integridade de membrana (Silva *et al.*, 2001).

CAPITULO 2 : AVALIAÇÃO DE TRÊS DIFERENTES DILUENTES E PROTOCOLOS PARA A CONGELAÇÃO DE SÊMEN A BASE DE TRIS

RESUMO

O objetivo com este estudo foi comparar os resultados provenientes de três diferentes protocolos de congelação de sêmen canino, sendo o Protocolo 1 (TRIS + GLICEROL 6%), 2 TRIS - ÁCIDO CÍTRICO- GLI 7% - OEP MODIFICADO, 3 (TRIS +GLICEROL 8%). Como doadores das amostras seminais foram utilizados 3 cães, com idade entre 1 e 6 anos, considerados hígdios após exame físico e clínico. Para cada protocolo, foram colhidas 3 amostras de cada cão (um total de 9 ejaculados), sendo o sêmen colhido por meio de de manipulação digital, procedendo-se as análises de volume, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermáticas. Após análises as amostras seguiram para os processos de congelação. Após uma semana as amostras foram descongeladas, e realizou-se novas análises de morfologia espermática, motilidade, vigor e porcentagem de espermatozóides vivos, sendo estes três últimos parâmetros reavaliados após 15 e 30 minutos de descongelação. Analisando os resultados obtidos após descongelação, o protocolo 2 apresentou melhores resultados imediatamente após descongelação, e após 15 e 30 minutos no que se refere a motilidade. Este também revelou melhor qualidade de vigor espermático, entretando não houve diferença significativa entre eles. Maior número de espermatozóides vivos foi encontrado nas amostras submetidas ao protocolo 2, bem como maior porcentagem de espermatozóides com morfologia normal após descongelação, apresentando diferença significativa entre os protocolos. Concluiu-se que o protocolo 2 parece oferecer melhor capacidade de manutenção das características da célula espermática, reduzindo os danos provocados pelo processo de congelação.

SUMMARY

The objective of this study was to compare the results among three different canine semen freezing protocols: Protocol 1 (TRIS + GLYCEROL 6%), 2 TRIS - ÁCIDO CÍTRICO- GLI 7% - OEP MODIFICADO), 3 (TRIS + GLYCEROL 8%). Three dogs were selected as donors with age between 1 and 6 years old, considered healthy after physical and clinical evaluation. For each protocol, 3 ejaculates were collected from each dog (total of 9 ejaculates/ protocol), being the semen collected by digital manipulation, followed by analyses of volume, motility, vigor, sperm morphology and concentration. After that the samples were submitted to a freezing process. One week later, the samples were unfrozen and the same analyses of morphology, motility, vigor, and percentage of living spermatozoa were done, being these last three parameters re-evaluated after 15 and 30 minutes from thawing. Analyzing the results obtained after thawing process, the protocol 2 showed better results immediately and at 15 and 30 minutes after this process, in what refers to motility. The protocol 2 also showed better vigor quality, however did not exist significant difference between 1 and 3. The highest number of living spermatozoa was noticed in samples submitted to protocol 2, as also higher percentage of spermatozoa with normal morphology after thawing process, showing significant difference among the protocols 1 and 3. In conclusion the protocol 2 seems to offer better maintenance capacity of the sperm cells characteristics, decreasing damages as the resulted from the freezing process.

I. INTRODUÇÃO

O grande número de animais em risco de extinção tem feito emergir a necessidade do aprimoramento de biotécnicas reprodutivas, com o intuito de preservação destas espécies. Além disso o aumento no interesse por parte dos criadores em incrementar a eficiência reprodutiva dos seus animais tem levado a um maior desenvolvimento da criação de cães. Neste sentido, a preservação de gametas masculinos é valioso método, uma vez que a congelação possibilita o armazenamento de material genético por um período de tempo ilimitado, preservando características de animais de alto valor genético por meio de gerações e mesmo após a morte do animal. O uso do sêmen congelado também inclui a possibilidade de transporte do sêmen para qualquer lugar e a qualquer momento, e até mesmo o uso de animais que não estejam aptos à realizar a monta natural.

O conceito de criopreservação do espermatozóide, implica na preservação de sua capacidade funcional, ou seja, a habilidade para produzir descendentes, o que necessariamente, envolve a manutenção da integridade celular, a habilidade em penetrar o oócito e a competência para suportar o desenvolvimento embrionário. Entretanto os processos de congelação e descongelação, causam diminuição na qualidade espermática e precisam ser otimizados, com a finalidade de maximizar a viabilidade do sêmen após este processo.

Com este estudo objetivou-se comparar a capacidade de manutenção da integridade do espermatozóide submetidos à três metodologias de congelação.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Estudar a influência de três diferentes diluentes contendo TRIS e protocolos de congelação na viabilidade espermática pós descongelação do sêmen canino.

2. 1. 2 Objetivos Específicos:

Após a congelação do sêmen canino em três diferentes diluentes: TRIS+GLI 6%; TRIS+ÁCIDO CITRICO+GLI 7%; TRIS+GLI 8%, objetivou-se avaliar motilidade, o vigor,

a percentagem de espermatozóides vivos e a morfologia espermática antes e imediatamente após descongelação.

- Estimar a motilidade, vigor e percentual de espermatozóides vivos aos 15 e 30 minutos após descongelação.

2.2 HIPÓTESE

O diluente à base de TRIS utilizado durante o processo de congelação promove resultados satisfatórios no que se refere ao comprometimento da qualidade das células espermáticas e ainda que estes protocolos e diluentes sejam adequado a nossa realidade financeira.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 3 cães para a coleta de amostras de sêmen; dois deles sem raça definida (com 3 e 6 anos de idade, 6 e 12 kg de peso corpóreo), e um da raça Bull Dog Inglês (1 ano de idade e 8kg de peso corpóreo). Os animais, provenientes da rotina de atendimento do setor de Obstetrícia Veterinária, do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel - Unesp, *campus* de FCAV-UNESP Jaboticabal, foram considerados hígidos após exame clínico e laboratorial (hemograma e bioquímico). Previamente ao experimento, os animais foram submetidos a um período de adaptação a coleta de sêmen por manipulação digital, e exame andrológico completo.

3.2 Coleta e análise do sêmen

Para cada protocolo (TRIS + GLICEROL 6%), (TRIS - ÁCIDO CÍTRICO- GLI 7% - OEP MODIFICADO), (TRIS +GLICEROL 8%), foram colhidas 3 amostras de cada cão (num total de 9 ejaculados), com intervalo de uma semana entre coletas. Foi realizada uma higienização do pênis e prepúcio com solução salina NaCl (0,9%) previamente a coleta. O sêmen foi colhido por massagem digital do pênis. Foram colhidas a segunda e parte da terceira fração espermáticas, utilizando tubos Falcons de 15 mL (Figura 01).

3.3 Análise dos ejaculados

Após coleta, o ejaculado foi mantido em temperatura ambiente, para análises macroscópica e microscópica.

A mensuração de volume e coloração do ejaculado foram realizadas imediatamente após coleta do sêmen (Figura 02).



Figura 01: Coleta de sêmen por compressão digital do bulbo. FCAV-Unesp Jaboticabal-2009



Figura 02: Amostra do sêmen em tubo plástico graduado durante avaliação de coloração e volume. FCAV-Unesp Jaboticabal-2009

As avaliações microscópicas foram realizadas utilizando microscópio óptico de luz (Nikon Eclipse E200[®]). Primeiramente realizou-se a avaliação da motilidade e vigor espermático por meio de de uma gota de sêmen fresco sob lâmina, coberta com lamínula, previamente aquecidas em placa térmica (Eletrovet[®]) a 37°C. A motilidade espermática foi avaliada sob aumento de 10x e de forma subjetiva (porcentagem de espermatozoides móveis), sendo que 0 era equivalente a nenhum espermatozoide móvel e 100; todos os espermatozoides com movimento progressivo. A determinação do vigor espermático foi realizada de acordo com a qualidade do movimento dos espermatozoides e classificado de acordo com a escala descrita no anexo 01. A concentração espermática foi realizada em câmara hematimétrica de Neubauer após diluição do sêmen na proporção de 1:20 (50µL de ejaculado e 950µL de água destilada). A contagem foi realizada em microscópio de contraste de fase, em aumento de 40x.

A detecção de eventuais defeitos na morfologia espermática, foi feita por meio de de um esfregaço de sêmen em lâmina de vidro, seguido da fixação em formol salina durante 10 minutos em banho maria, à 37°C, posteriormente secos em temperatura ambiente. Ato contínuo as lâminas foram coradas pelo método de Karras modificado por Papa et al., (1988). Foi realizada a contagem de 100 células em microscópio de contraste de fase, com objetiva de imersão (100x). Os defeitos de morfologia

espermática foram classificados em defeitos maiores e menores segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen de Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

Padronizamos as amostras à serem utilizadas em nosso de congelação de sêmen somente aquelas que exibiram motilidade mínima de 70%, vigor superior a 3, e anormalidades morfológicas espermáticas inferiores a 30%.

3.4 Processo de Congelação do Sêmen

Cada cão forneceu 3 ejaculados, com intervalo de uma semana entre as coletas; num total de 9 ejaculados para a realização de cada protocolo de congelação.

3.4.1 Protocolo 1 (TRIS + GLICEROL 6%)

Para a realização do protocolo 1, utilizou-se método descrito por Silva et al., (2006) modificado pois realizamos única adição de glicerol durante o processo. A base do tampão TRIS está descrita no anexo 02. Após a preparação foi adicionado 6% de glicerol.

As amostras foram mantidas a temperatura de 27°C, por 10 minutos e em seguida as alíquotas de sêmen foram diluídas em TRIS na mesma temperatura. As amostras foram colocadas em caixas de isopor contendo gelo reciclável por 40 minutos, onde atingiram a temperatura de 15°C, e logo levadas a um refrigerador de bancada a temperatura de 4°C por mais 30 minutos. Seguido este processo as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, lacradas com álcool polivinílico, sendo a concentração espermática final de 80×10^6 espermatozoides/mL. As palhetas foram expostas durante 5 minutos ao vapor de nitrogênio, em suporte de metal, posicionado a 5 cm de distância do nível de nitrogênio líquido. Logo, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido e acondicionadas em botijão criobiológico a -196°C durante uma semana. Após este período procedeu-se a descongelação das amostras, com imersão das palhetas em banho-maria a 38°C por 1 minuto. Foram realizadas as avaliações de motilidade e vigor espermáticos, e confecção de lâminas para futura avaliação da morfologia espermática, no momento da descongelação, 15 e 30 minutos após

descongelamento.

A metodologia empregada nestas avaliações foi a mesma descrita anteriormente para a avaliação destes parâmetros nas amostras de sêmen a fresco.

3.4.2 Protocolo 2 (TRIS - ÁCIDO CÍTRICO- GLI 7% - OEP MODIFICADO))

O protocolo 2 foi realizado de acordo com o processo de congelamento descrito por Peña (2000) modificado por Martins (2005). Após análises, o ejaculado foi centrifugado a 800 g por 10 minutos (Centrífuga TDL80-2B[®]). O “pellet” obtido foi ressuspensionado em meio diluente utilizado por PEÑA & LINDE-FORSBERG (2000) e modificado por Martins (2005) e descrito no anexo 03, sendo a concentração final de 80×10^6 espermatozoides/mL.

Após diluição, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, lacradas com álcool polivinílico e levada a um refrigerador, com temperatura constante de 5°C, por um período de uma hora. As palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio, em suporte de metal, posicionada a 6,0 cm do nível de nitrogênio líquido, durante 20 minutos. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico.



Figura 03: Amostras espermáticas envasadas, em refrigerador a temperatura de 5°C. FCAV-Unesp Jaboticabal-2009.

O processo de descongelamento foi realizado mergulhando as palhetas em banho-maria a 72°C por 8 segundos, utilizando termômetro para o controle exato da temperatura da água no interior do recipiente do banho-maria. Imediatamente após a

descongelamento, o sêmen da palheta foi diluído em 0,5 mL do meio utilizado (TRIS - ácido cítrico - OEP modificado, sem glicerol). As amostras foram colocadas em tubos plásticos de 1,5 mL, e mantidas em placa térmica a 37°C durante as análises pós-descongelamento. Foram realizadas as avaliações de motilidade e vigor espermático, e confecção de lâminas para futura avaliação da morfologia espermática, no momento da descongelamento, 15 e 30 minutos após descongelamento. A metodologia empregada nestas avaliações foi a mesma descrita anteriormente para a avaliação destes parâmetros nas amostras de sêmen a fresco.

3.4.3 Protocolo 3 (TRIS +GLICEROL 8%)

Foi utilizado o protocolo de congelamento descrito por SANTOS (1998) onde o glicerol adicionado como diluente, em concentração de 8%, e como protetor a gema de ovo à 20%.

Após diluição as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL sendo a concentração espermática em cada palheta de 80×10^6 espermatozoides/mL.

Primeiramente as palhetas foram levadas a refrigerador a 4°C por 30 minutos. Em seguida foram expostas ao vapor de nitrogênio, colocadas sobre suporte de metal, à 5 cm do nível de nitrogênio líquido dentro da máquina de congelamento (xxx), obedecendo a curva de congelamento descrita na Tabela abaixo, sendo a temperatura monitorada por termômetro digital.

Tabela 1: Curva de congelamento do sêmen canino utilizada durante a realização do protocolo 2. FCAV-Unesp Jaboticabal 2009.

Temperatura	Resfriamento
+4°C à -20°C	6°C/min
-20°C à -80°C	15°C/min
-80°C à -100°C	8°C/min
-100°C à -115°C	5°C/min
-115°C à -196°C	Palhetas mergulhadas no nitrogênio líquido

Ato contínuo as palhetas foram levadas ao botijão criobiológico, permanecendo

congeladas por uma semana

O processo de descongelação foi realizado mergulhando as palhetas em banho-maria à 37°C, durante 30 segundos (Farstad,1996). As amostras foram colocadas em tubos plásticos de 0,5 mL e mantidas em placa térmica a 37°C durante as análises pós-descongelação. Foram realizadas as avaliações de motilidade e vigor espermático, e confecção de lâminas para futura avaliação da morfologia espermática, no momento da descongelação, 15 e 30 minutos após descongelação. A metodologia empregada nestas avaliações foi a mesma descrita anteriormente para a avaliação destes parâmetros nas amostras de sêmen a fresco.

3.4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada momento de análise das amostras de sêmen (fresco, 0, 15, 30 minutos) em cada parâmetro (motilidade, vigor, morfologia espermática e porcentagem de espermatozóides vivos) foram analisados separadamente, num total de 16 análises.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SAS¹. Cada parâmetro foi examinado quanto a normalidade de distribuição. Sendo esta normal, o teste ANOVA foi aplicado afim de se encontrar supostas diferenças significativas entre os diferentes momentos dentro de cada protocolo, e PDIFF foi usado como “post-hoc test” para determinar as diferenças entre os tratamentos. Quando os resultados não foram considerados em distribuição normal, o teste Kruskal-Wallis foi aplicado afim de se encontrar supostas diferenças significativas entre os diferentes momentos dentro de cada protocolo e o “post-hoc test” para determinar as diferenças entre os tratamentos. Diferença significativa foi considerada quando $p < 0,05$.

¹ SAS: Statystical Analysis System (Inst. Inc., Cary, NC)

IV. RESULTADOS

Todas as amostras de sêmen a fresco apresentaram coloração característica. Os valores de parâmetros espermáticos como volume da segunda fração, concentração, motilidade, vigor e morfologia estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros seminais caninos determinados imediatamente após coleta (n=9) (Média \pm Desvios Padrão; p <0,05), FCAV-Unesp Jaboticabal, 2009.

Cão	Volume (mL)	Concentração ($\times 10^6$ sptz/mL)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Morfologicamente normais (%)
A	2,20 \pm 0,8 ^{Aa}	713,0 \pm 215,0 ^{Aa}	91,6 \pm 5,0 ^{Aa}	5,0 \pm 0,0 ^{Aa}	86,93 \pm 10,9 ^{Aa}
B	2,26 \pm 0,5 ^{Aa}	774,0 \pm 189,2 ^{Aa}	93,3 \pm 8,2 ^{Aa}	5,0 \pm 0,0 ^{Aa}	86,86 \pm 12,4 ^{Aa}
C	2,23 \pm 0,3 ^{Aa}	665,0 \pm 210,6 ^{Aa}	90,0 \pm 7,1 ^{Aa}	5,0 \pm 0,0 ^{Aa}	85,80 \pm 8,7 ^{Aa}
Média\pmDV	2,23 \pm 0,5 ^{Aa}	717.3 \pm 204,9 ^{Aa}	91.6 \pm 6,7 ^{Aa}	5,0 \pm 0,0 ^{Aa}	86.53 \pm 10,6 ^{Aa}

Valores seguidos de letras maiúsculas indicam diferenças entre colunas e letras minúsculas indicam diferenças entre linhas. Sptz= espermatozóides, DV= Desvio padrão.

Os parâmetros seminais foram considerados normais para a espécie canina e não houve diferenças significativas. Em todos os animais os valores observados após descongelamento foram inferiores comparados com parâmetros a fresco.

A Tabela 3 contém os valores de motilidade do sêmen fresco e descongelado em diferentes tempos após o processo de descongelamento para cada um dos três protocolos utilizados, e a Figura 4 ilustra o declínio da motilidade espermática após processo de congelamento.

Tabela 3: Avaliação da motilidade espermática nas amostras de sêmen canino; antes, no momento da descongelação 0 min e após 15 e 30 minutos de descongelação de acordo com os procolos 1, 2 e 3. FCAV-Unesp Jaboticabal, 2009.

Avaliações	Motilidade espermática		
	Protocolos		
	1	2	3
Fresco	92,44±2,5 ^{Aa}	92,77±2,6 ^{Aa}	91,66±3,7 ^{Aa}
0 minutos	47,22±3,7 ^{Ba}	57,88±6,4 ^{Ba}	52,55±6,5 ^{Ba}
15 minutos	27,44±4,3 ^{Ca}	37,0±4,3 ^{Ca}	29,77±6,1 ^{Ca}
30 minutos	20,00±4,3 ^{Ca}	22,27±5,6 ^{Ca}	19,22±6,3 ^{Da}

Valores seguidos de letras diferentes maiúsculas indicam diferenças entre linhas e letras minúsculas indicam diferenças entre colunas.

Analisando cada protocolo separadamente, de acordo com cada momento das análises, observa-se uma diminuição significativa ($p=0.03$) nos valores médios da motilidade para as amostras a fresco e no momento da descongelação (0), bem como entre 15 e 30 minutos após descongelação ($p=0.005$). Apenas no protocolo 3 houve diferença significativa após 30 minutos de descongelação ($p=0.007$) comparado com os valores obtidos em 15 minutos.

Não houve diferença significativa entre os valores de motilidade espermática obtidos com a utilização de cada protocolo, ao compará-los dentro de cada período analisado.

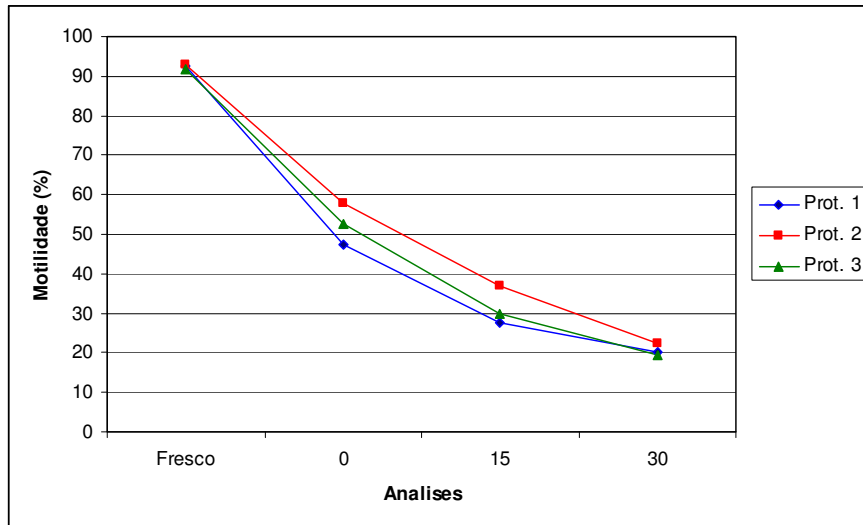


Figura 04: Valores obtidos de motilidade espermática durante a descongelação de acordo com momentos avaliados, sendo Prot.1: Protocolo 1; Prot.2: Protocolo 2; Prot. 3: Protocolo 3.

Quanto ao vigor espermático não foi observada diferença significativa na comparação entre os protocolos dentro de cada momento analisado individualmente (Figura 5, Tabela 4).

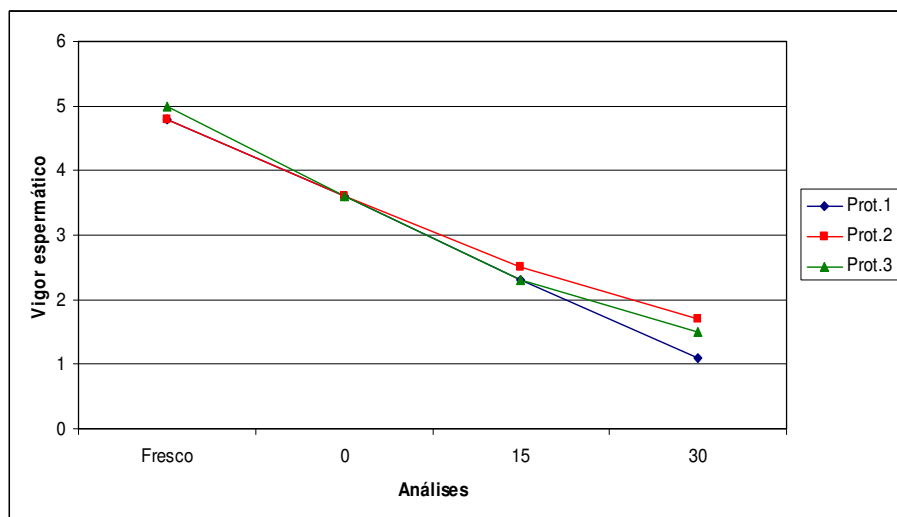


Figura 05: Valores obtidos de vigor espermático durante a descongelação de acordo com momentos de análise das amostras submetidas aos 3 diferentes protocolos de congelamento, sendo Prot.1: Protocolo 1; Prot.2: Protocolo 2; Prot. 3: Protocolo 3.

Tabela 4: Vigor espermático nas amostras de sêmen canino; antes, no momento da descongelação e após 15 e 30 minutos de descongelação de acordo com os protocolos 1, 2 e 3. FCAV-Unesp Jaboticabal, 2009.

Avaliações	Vigor espermático		
	Protocolos		
	1	2	3
Fresco	4.8±0.3 ^{Aa}	4.2±0.3 ^{Ca}	5.0±0.0 ^{Aa}
0 minutos	3.6±0.5 ^{Bb}	3.6±0.5 ^{Bb}	3.6±0.7 ^{Bb}
15 minutos	2.3±0.5 ^{Bb}	2.5±0.7 ^{Bb}	2.3±0.4 ^{Bb}
30 minutos	1.1±0.3 ^{Bb}	1.7±0.4 ^{Bb}	1.5±0.5 ^{Bb}

Valores seguidos de letras diferentes maiúsculas indicam diferenças entre linhas e letras minúsculas indicam diferenças entre colunas.

Entretando foi possível observar um declínio em todos os protocolos, no vigor espermático das amostras entre as análises das amostras a fresco e imediatamente após descongelação, sendo a média dos valores do protocolo 2 diferentes estatisticamente daquelas referentes ao protocolo 1 ($p=0.002$) e 3 ($p=0.01$), embora os protocolos 1 e 3 sem diferença significativa entre eles ($p=0.07$), quando comparou-se as amostras à fresco e em 0 minutos após a descongelação. Os valores após 15 e 30 minutos de descongelação foram superiores no protocolo 2, entretando esses valores não foram significativos. A Figura 05 ilustra esse declínio do vigor espermático durante o processo de descongelação.

Analisando os resultados no que se refere a porcentagem de espermatozóides vivos após descongelação, foram observados 69,4; 71,1 e 42,2% dos espermatozóides vivos imediatamente após descongelação respectivamente das amostras provenientes dos protocolos 1, 2 e 3; havendo diferença significativa entre esses valores após descongelação sendo a porcentagem de espermatozóides vivos verificada no protocolo 1 superior ao 3 ($p=0,0097$), mas não houve diferença significativa na comparação entre

os protocolos 1 e 2 apesar deste último ser superior. Nas avaliações após 15 minutos de descongelação houve diferença significativa entre os valores, sendo a porcentagem de espermatozóides vivos após protocolo 2 superiores ao 3 ($p=0,002$), mas não houve diferença significativa quando comparamos os protocolos 1 e 3.

Ao se verificar os resultados obtidos individualmente de cada protocolo em cada momento analisado, todos os protocolos apresentaram diminuição significativa imediatamente, após 15 e 30 minutos da descongelação, os valores estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Porcentagem de espermatozóides vivos nas amostras de sêmen canino; antes, no momento da descongelação e após 15 e 30 minutos de descongelação de acordo com os protocolos 1, 2 e 3. FCAV-Unesp Jaboticabal, 2009.

Avaliações	Espermatozóides vivos		
	Protocolos		
	1	2	3
Fresco	92,5±2,6 ^{Aa}	95,0±0,0 ^{Aa}	93,8±2,2 ^{Ba}
0 minutos	69,4±4,6 ^{Cb}	71,1±16,9 ^{Cb}	42,2±18,5 ^{Cb}
15 minutos	33,3±5,0 ^{Dc}	47,77±2,6 ^{Ec}	20,0±4,3 ^{Dc}
30 minutos	12,7±3,6 ^{Fd}	20,0±3,5 ^{Fd}	11,1±2,2 ^{Fd}

Valores seguidos de letras maiúsculas indicam diferenças entre linhas e letras minúsculas indicam diferenças entre colunas.

Os resultados obtidos durante a avaliação de morfologia espermática estão representados na Tabela 6. Uma redução significativa ($p=0,02$), foi observada no número de espermatozóides morfolologicamente normais, ao se comparar os valores nas amostras a fresco e descongeladas, em todos os protocolos realizados.

Verificou-se que o protocolo 2 obteve média superior de espermatozoides normais após descongelação (88,21%), representando diferença significativa ao se comparar com os protocolos 1 e 3, sendo $p=0,009$ e $p=0,006$ respectivamente para estes. Entretanto estes não diferiram entre si. Além disso o protocolo 2 resultou em

menor número de espermatozoides com defeitos maiores e maior número de defeitos menores, sendo significativamente diferente dos protocolos 1 e 3, ($p=0,004$).

Tabela 6: Valores médios obtidos durante análises de morfologia espermática nas amostras de sêmen canino a fresco e após processo de descongelação. FCAV-Unesp Jaboticabal, 2009.

Morfologia	Protocolos		
	1	2	3
Fresco (% anormais)	5,7±0,1 ^{Aa}	4,2±0,3 ^{Aa}	7,1±0,2 ^{Aa}
Descongelado (% anormais)	13,86±2,1 ^{Bb}	11,79±1,4 ^{Bc}	14,66±1,3 ^{Bb}
Defeitos Maiores	0,80±0,02 ^a	0,53±0,1 ^b	0,76±0,05 ^a
Defeitos Menores	13,06±0,9 ^a	11,26±1,5 ^b	13,9±0,7 ^a
% Total de normais após descongelação	86,13±2,9 ^a	88,21±5,6 ^b	85,33±3,2 ^a

Valores seguidos de letras maiúsculas indicam diferenças entre linhas e letras minúsculas indicam diferenças entre colunas.

V. DISCUSSÃO

O tampão TRIS contendo gema de ovo foi escolhido como constituinte na base dos três protocolos de congelação avaliados, devido aos bons resultados obtidos após este processo, além de satisfatórias taxas de fertilidade relatados por WEISS et al., (2000). Segundo Silva et al., (2002) o TRIS é um tampão que preserva a energia do espermatozóide por meio da redução do índice de frutólise celular e sua atividade tamponante promove a remoção de íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo da célula.

Rotineiramente tem sido utilizada a associação do TRIS com a gema de ovo na constituição do meio diluente, por proteger o espermatozóide do choque térmico e agir na superfície da membrana plasmática, prevenindo lesão da mesma conforme relatado por SILVA (1999).

Na avaliação seminal após descongelação, utilizando três diluentes e três protocolos verificamos importante comprometimento de todos os parâmetros analisados, quando comparados aos do sêmen fresco. Esta observação está de acordo com as descrições realizadas por Oliveira (1999), Peña e Martinez (2000), Silva (2006); que não utilizaram os mesmos métodos de congelação deste estudo, o que nos facultaria dizer que o ato de congelar é o aspecto que causa maior agressão aos espermatozoides (SILVA et al., 2003b).

Neste estudo foram observados no protocolo 1, 47,22%; 27,44% e 20,0% dos espermatozoides móveis; imediatamente após processo de descongelação, e após 15 e 30 minutos deste respectivamente. Esses valores foram inferiores aos observados por Silva et al., (2006) que observaram 56,5%; 43,6% e 28,6% nos mesmos intervalos de avaliação, utilizando o mesmo meio diluente. No entanto Silva et al., (2006) realizaram a adição fracionada de glicerol até atingir concentração de 6%, enquanto neste estudo a adição de glicerol foi realizada em uma única vez, fato este que pode ter sido responsável por tal diferença entre resultados. No que se refere ao protocolo 2, nossos resultados (57,8%), se mostraram homogêneos comparados com os valores encontrados por Martins (2005) na qual observou uma grande variabilidade entre 88% à 24% de motilidade espermática após descongelação utilizando mesmo processo de

congelamento. Uma motilidade espermática inferior foi observada ao se comparar os resultados imediatamente após descongelamento provenientes do protocolo 3 (52,55%) enquanto Santos (2004) refere taxas de 58,0% utilizando o mesmo protocolo. É importante ressaltar que os resultados referentes à este protocolo foram inferiores, provavelmente este ter curva de congelamento mais rápida quando comparado aos outros protocolos, e este fato causa importantes alterações à célula espermática tornando relativamente impermeável à água, o fluido intracelular não consegue sair da célula tão rapidamente ocorrendo a formação de cristais de gelo em seu interior causando ruptura da membrana e conseqüentemente morte do espermatozóide, assim relatado por England (1993). Acredita-se que variações individuais na qualidade espermática entre os doadores podem ser atribuídas aos resultados, pois o sêmen congelado não foi constituído de “pools” de amostra seminal dos cães.

De forma geral, o declínio na motilidade espermática é devido as injúrias sofridas durante o processo de congelamento, decorrentes das alterações físico-químicas que levam a ruptura da membrana plasmática e a conseqüente perda de proteínas desta; alterações na estrutura lipídica da camada lipoprotéica; alterações osmóticas e rearranjos iônicos oriundos da adição do crioprotetor (HOLT, 2000).

Observou-se que os valores de vigor espermático referentes ao protocolo 1 declinaram significativamente em relação as amostras a fresco e imediatamente após descongelamento. Entretanto ao avaliarmos os três momentos pós descongelamento (0, 15 e 30 minutos) os valores continuaram a decrescer, mas sem diferença significativa entre eles. Estes resultados diferem dos encontrados por Silva et al., (2006) os quais verificaram a manutenção destes por até 15 minutos após descongelamento, mas diminuíram significativamente após 30 minutos utilizando o mesmo diluente.

A longevidade espermática após descongelamento tem sido conservada por alguns autores por até oito horas, através da adição de produtos derivados de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), como pastas Equex STM e Orvus (PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000; ROTA et al., 1997). Tsutsui et al., (1989) relataram que o espermatozóide canino é capaz de alcançar a tuba uterina em até três minutos após sua deposição intravaginal. Além disso foi sugerido por Strom et al., (1997) que a baixa longevidade espermática

não está necessariamente associada a baixa fertilidade. Estes autores obtiveram 74% de espermatozóides móveis logo após descongelação, declinando para 20% após 60 minutos a 37°C, e ainda assim obtiveram 85% de fertilidade no uso desse sêmen após deposição intrauterina.

Com relação a morfologia espermática, todos os protocolos permitiram uma boa conservação da mesma, já que apresentaram valores maiores que 80% de espermatozóides normais após descongelação, achados que encontram similaridade nas descrições de Christiansen et al., (1988) para sêmen de boa qualidade.

O protocolo 2 foi superior aos demais após descongelação no que se refere a este parâmetro, apresentando um menor percentual de alterações, que podem ter sido ocasionadas pelos procedimentos de congelação e descongelação, choques térmicos os quais o espermatozóide é submetido (FARSTARD, 1996). O fenômeno biológico da diminuição em torno de 7,5% do número de espermatozóides íntegros após descongelação encontrados em nossas amostras diluídas em TRIS-citrato-glucose está de acordo com o relato de Terhaer (1993), onde informou sobre uma diminuição de até 30%.

Após avaliarmos todos os parâmetros seminais nos períodos de pós congelação de modo comparativo podemos comentar que o protocolo 2 foi melhor do que os demais, ainda que não tenha havido sob a luz da avaliação estatística algum tipo de diferença. Complementarmente acreditamos ser importante frisar uma vez mais ter sido o protocolo de número 2 superior, fato que verificamos pelos dados biológicos obtidos em motilidade, vigor e morfologia espermática, após descongelação.

Entretanto, esse grupo não diferiu significativamente dos demais quanto a motilidade, vigor espermático e porcentagem de espermatozóides vivos após descongelação. A motilidade pós-descongelação obtida no protocolo 1 ($47,22 \pm 3,7\%$) não está na faixa ideal (50-65%) para realização de inseminação artificial com sêmen congelado relatada por Concannon & Batista (1989). Os melhores resultados provenientes do protocolo 2, foram provavelmente devido a uma associação dos efeitos crioprotetores da gema de ovo, glicerol e Orvus es Paste modificado, protocolo descrito por Martins (2005).

A adição de detergentes, como o SDS (dodecil sulfato de sódio) como um dos componentes do Equex STM Paste® (Nova Chemical Sales, Scituate Inc., M.A., EUA) e Orvus es Paste® (Proctor & Gamble, Cincinnati, OH, EUA) no meio diluente tem sido preconizada, pelos seus benefícios, favorecendo a ação dos fosfolipídeos da gema de ovo e aumentando a proteção do espermatozóide contra o choque térmico, também relatado por PEÑA et al., (2003), e Martins (2005).

Apesar de o espermatozóide canino ser considerado relativamente resistente às crioinjúrias, OLAR (1984) observou que a congelação deste na ausência de um crioprotetor, assim como em outras espécies, resulta em uma alta redução no número de espermatozoides móveis após a descongelação. Esse efeito protetor do glicerol deve-se ao fato do mesmo permear a membrana celular, permitindo a desidratação da célula através da saída de água por osmose de acordo com Hammerstedt et al., 1990), evitando a formação de cristais de gelo que poderão promover a ruptura da membrana plasmática do espermatozóide. Conforme Oliveira et al.,(1999), o glicerol a 6% adicionado a diluentes TRIS-gema proporcionou queda significativa na motilidade e vigor dos espermatozoides descongelados, assemelhando-se aos resultados obtidos neste trabalho após protocolo 3 e por Santos (2004). Por outro lado Weiss et al., (2000) relataram que melhores resultados, 65% de motilidade foram obtidos com TRIS-gema acrescido de 6% de glicerol, divergindo dos resultados acima descritos. Esta variação pode ser atribuída a adição de Equex ao diluente e pelas concentrações dos outros componentes utilizados na formulação do diluente preconizado pelos referidos autores.

VI. CONCLUSÃO

- O protocolo de congelação TRIS+ÁCIDO CÍTRICO+GLI 7%, apesar de não revelar diferença estatística, ofereceu melhores condições biológicas de manutenção da integridade das células espermáticas após processo de congelação.

- Foi possível observar um decréscimo nos valores referentes à todos os parâmetros espermáticos analisados após descongelação.

- As amostras submetidas ao protocolo 2 apresentaram resultados superiores de motilidade, vigor, percentagem de espermatozóides vivos imediatamente após descongelação.

Os diluentes à base de TRIS ofereceram boas condições da qualidade do sêmen após processo de descongelação.

VII. REFERÊNCIAS

ABE, Y.; LEE, D.S.; SANO, H., AKIYAMA, K., YANAGIMOTO-UETA, Y., ASANO, T., SUWA, Y., SUZUKI, H. Artificial Insemination with Canine Spermatozoa Frozen in a Skim Milk/Glucose-Based Extender. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, n.4, p.290-94, 2008.

BESSA, A.M.; ROCHA, A., MAYENCO-AGUIRRE. Comparing ethylene glycol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. **Theriogenology**, n.66, p. 2047-2055, 2006.

BOUCHER, J., FOOTE, R.H., KIRK, R.W. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. **Cornell Veterinary**, n.48, p. 67-86, 1958.

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

CONCANNON. P.W., BATTISTA M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. **Current veterinary therapy. Small animal practice**, X. Philadelphia: Saunders, p.1247-1289, 1989.

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

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

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

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p. 243 -255, 1993.

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

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. W. B. Saunders Company (Philadelphia), 1996.

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

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

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, 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.1143-58, 2001.

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

KIM, Y.J., PARK, Y.J., KIM, B.J., YU, I.J. Artificial insemination with frozen semen in the dog – simple freezing method using methanol. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 4, p. 851-855, 1994.

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

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

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

OETTLE, E. E. & SOLEY, J.T. Anomaliás de los espermatozoides en el perro. **Noticias Medico Veterinarias**, Buenos Aires, v. 59, p. 28-70, 1998.

OLAR, T.T. **Cryopresevation of dog semen**. Colorado, 1984. Tese Doutorado-Colorado State University, 1984.

OLAR, T.T., BOWEN, R.A., PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and do sêmen processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 31, p. 451-61, 1989.

OLIVEIRA, J.V.L.; BARRETO, C.S.; FILHO, A.I.R. Avaliação de sêmen canino pós descongelação utilizando-se Tris-gema e lactose-gema em quatro diferentes periodo de equilibrio. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p.308-309, 1999.

- PEREIRA, B.S., SILVA, A.R., UCHOA, D.C., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Comparação da monta natural e inseminação artificial com sêmen diluído em água de coco em cadelas da raça Boxer. **Ciência Animal**, n. 11, v. 2, p. 97-100, 2001.
- PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoal concentration and post thaw dilution rate and survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 703-718, 2000.
- PEÑA, A.I., LUZ, L.L., BARRIO, M., HERRADÓN, P.G., QUINTALA, L.A. Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, p. 1725-39, 2003.
- POLGE, C., SMITH, A.U., PARKERS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, n. 2, p. 164-166, 1949.
- PONGLOWHAPAN S., CHATDARONG K. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. **Theriogenology**, n. 69, v. 6, p. 666-72, 2008.
- PLATZ, C.C., SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Laboratory Animal Science**, n. 27, p. 1013 – 1016, 1977.
- RAVASZOVA, O., MESAROS, P., CINGAKOVA, V., LUKACINOVA, M. A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage. **Folia Veterinaria**, n. 40, p. 95-99, 1996.
- ROTA, A. et al., 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., IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.; LINDE FORSBERG, C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without equex STM paste. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p.1045-1058, 1999.
- SANTOS, S.E.C., VANNUCCHI, C.I., SATZINGER, S.A., ASSUMPÇÃO, M.E.O.D'A., VISINTIN, J.A. Comparison of five extenders for canine semen freezing. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v. 36, n. 5, 1999.
- SANTOS, I.W. **Albumina serica bovina como fonte proteica do diluente Tris (hidroximetil amino metano) para a congelacao do semen canino.** Tese (doutorado).Universidade Estadual Paulista, FCAV-UNESP Jaboticabal, 2004.
- SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. **Artificial Insemination Digest**, p.17-26, 1969.

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

SILVA, A.R., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Uso da sonda de Osíris na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Rottweiler. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 5, p. 147-149, 2002.

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

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Principais aspectos ligados a aplicação da inseminação artificial na espécie canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, n. 98, p. 53-60, 2003b.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Comparação entre água de coco em pó (ACP) e o Tris como diluentes na criopreservação do semen de cães. **Brazilian Journal Veterinary Research Medicine**, v. 43, n. 6, p. 767-774, 2006.

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

SILVA, L.D.M. Tecnologia do sêmen canino. In: Simpósio Cearense de Ciência Animal, 1, 1999, Fortaleza, CE. Anais...Fortaleza: **Sociedade Cearense de Ciência Animal**, v.1, p. 43-49, 1999.

STORNELLI, M.A., STORNELLI, M.C., ARAUZ, M.S., SAVIGNONE, C.A., GARCÍA, M., DE LA SOTA, R.L. Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado refrigerado a 4 °C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 468-470, 2001.

STROM, 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.

TERHAER, P. **Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma: Motilität, ATP-Konzentration und Akrosomintegrität der Spermien bei Zusatz unterschiedlicher Glycerinkonzentrationem sowie von Seminalplasma zum verdünnten bzw. Aufgetauten Samen.** Hannover, Alemanha, 1993, 89p. Tese livre docência. Tierärztliche Hochschule, Hannover.

TSUTSUI, T. et al., Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 51, p. 560-565, 1989.

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. **Japanese Veterinary Medical Science**, n. 62, p. 603-606, 2000.

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

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of sperm and assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v.7, p.871-92, 1995.

WATSON, P.F. Artificial insemination and the preservation of semen. In: LAMMING, G.E. (Ed). **Marshall's physiology of reproduction**, 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, v. 2, p. 747-869, 1990.

WEISS R.R.; RODASKI, S.; BUCHELE, J.M.; SANTOS, I.W.; ALMEIDA, L.M. Estudo preliminary de algumas características do semen canino congelado. **Archives of Veterinary Science** v. 5, p. 67-71, 2000.

CAPÍTULO 3: Inseminação artificial intrauterina com sêmen fresco e descongelado por videolaparoscopia em cadelas.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de concepção em cadelas após inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia. Um total de 20 cadelas foram inseminadas, sendo 10 com sêmen fresco e 10 com sêmen congelado. Os animais se encontravam em estro natural e sob acompanhamento da citologia vaginal. Quando aproximadamente 90% das células se apresentaram cornificadas, foram realizadas dosagens séricas de progesterona afim de se determinar o momento exato da inseminação. Três machos foram utilizados como doadores de sêmen e as coletas foram realizadas por manipulação digital. Após coleta o ejaculados foram analisados quanto ao volume, motilidade, vigor e concentração espermática. Para a inseminações utilizando sêmen fresco, a coleta foi realizada momentos antes do procedimento, e o sêmen acondicionados em banho-maria a 37°C até o momento da inseminação. Amostras destinadas a inseminação com sêmen descongelado, obtiveram mesmo processo de análises após coleta, seguindo para o processo de congelação, permanecendo congeladas por no mínimo uma semana, e então descongeladas momentos antes do procedimento. De acordo com os concentrações séricas de progesterona, as inseminações intrauterinas por videolaparoscopia foram realizadas, sendo cada corno uterino inseminado com 1mL de sêmen, em concentração de 250×10^6 espermatozoides/mL nas cadelas inseminadas com sêmen fresco e 80×10^6 espermatozoides/mL naquelas inseminadas com sêmen congelado. Após 7 dias as cadelas foram ováriosalpingohisterectomizadas, sendo o lúmen das tubas e cornos uterinos lavados com solução de PBS. Embriões foram encontrados nos lavados de 7 cadelas inseminadas com sêmen fresco, e em 5 inseminadas com sêmen descongelado. Concluiu-se que o procedimento de inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia revelou ser alternativa interessante como biotécnica reprodutiva principalmente no uso de sêmen descongelado.

PALAVRAS CHAVE: inseminação artificial, cadelas, videolaparoscopia

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the fertility in bitches after intrauterine artificial insemination by videolaparoscopy. A total of 20 bitches were inseminated, being 10 with fresh semen and 10 with frozen. The animals were in natural oestrus, and their vaginal cytology was followed. When approximately 90% of the cells were cornificated, evaluation of serum levels of progesterone was performed, with the objective to determinate the exact moment of the artificial insemination. Three males were used as donors, and the samples collection was performed by digital manipulation. After collection the ejaculates were analysed considering volume, motility, vigor and sperm concentration. For the inseminations using fresh semen the collection was performed minutes before the process, and the semen sample was maintained at 37°C. Samples destined to inseminations using frozen semen were submitted to the same analysis process after collection, followed by the freezing process, being frozen during a minimum period of one week, and thawing moments before the procedure.

According to the serum levels of progesterone, the intrauterine inseminations by videolaparoscopy were performed, being each uterine corn inseminated with 1 mL of semen, with 250×10^6 espermatozoa/mL in bitches with fresh semen and 80×10^6 espermatozoa/mL in bitches with frozen semen.

After 7 days the bitches were ovariohysterectomized, and the lumen of the uterine tube and corns were flushed with PBS solution. Embryos were found in 7 bitches inseminated with fresh semen, and in 5 inseminated with frozen semen. It was concluded that the intrauterine artificial insemination by videolaparoscopy seems to be an interesting reproductive biotechnology method, especially in what refers to the use of frozen semen.

KEY WORDS: artificial insemination, bitches, videolaparoscopy

I. INTRODUÇÃO

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

A IA em cães seria apenas o começo de uma nova era para a reprodução e otimização do material genético de canídeos domésticos e selvagens, uma vez que as biotecnologias estabelecidas para esta espécie poderiam servir como base para estudos que visem a preservação e difusão do material genético oriundo de canídeos selvagens ameaçados de extinção (WAYNE e VILA, 2001). Sendo assim essa técnica pode ser utilizada ainda como alternativa na impossibilidade de monta natural e ainda, a utilização de sêmen congelado, o que possibilita a manutenção da capacidade fecundante em animais de alto interesse zootécnico por tempo indeterminado, além de evitar o estresse causado pelo transporte para fins de acasalamento (GUÉRIN, 1998).

Porém, os resultados obtidos por meio da IA com sêmen canino congelado são ainda bastante heterogêneos (LINDE-FORSBERG, 1989; SILVA et al., 1995).

Nesse sentido, com o presente estudo objetivou-se a avaliação da fertilidade, por meio da inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia, utilizando sêmen fresco e descongelado.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Observar em cadelas a taxa de concepção após IAIU por videolaparoscopia com a utilização de sêmen fresco e descongelado.

2.1.2 Objetivos Específicos:

- Verificar no 7º dia após a IA o número de embriões e oócitos nas tubas e cornos uterinos.
- Correlacionar o número de corpos lúteos ovarianos com o número de embriões e oócitos obtidos.
- Analisar a localização do maior número de embriões após 7 dias de inseminação artificial.
- Verificar se o método de lavagem é eficiente na recuperação de embriões.
- Verificar se a concentração sérica de progesterona associada a colpocitologia contribuiu no diagnóstico do correto período de ovulação.

2.2 HIPÓTESE

A IAIU por videolaparoscopia pode ser um método de eleição para o uso em espécies de canídeos com interesse de preservação.

III. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Foram utilizadas 20 fêmeas caninas, sem raça definida, com idade entre 1 e 6 anos, consideradas híginas após exame físico e laboratorial, provenientes do atendimento do setor de Obstetrícia Veterinária, do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel - Unesp, *campus* de FCAV-Unesp Jaboticabal.

As cadelas necessariamente se encontravam em estro natural, comprovado por citologia vaginal e dosagens séricas de progesterona.

Três machos da espécie canina, com idade entre 1 e 5 anos de idade, considerado híginos após exames físico, laboratorial e andrológico, foram utilizados para a coleta de sêmen.

3.2 Citologia vaginal e dosagens de progesterona

A partir da observação dos primeiros sinais de proestro, tais como secreção vaginal sanguinolenta e edema de vulva, realizou-se a análise da citologia vaginal para se detectar as mudanças no perfil citológico, de acordo com a fase do ciclo estral.

Amostras sanguíneas foram colhidas no momento em que aproximadamente 90% das células do epitélio vaginal se apresentavam cornificadas.

As fêmeas que apresentavam concentrações de progesterona inferiores a 2,0 ng/mL, eram submetidas à novas dosagens a cada 24h, até que as concentrações se apresentassem entre 2,0 e 10 ng/mL. As cadelas eram então inseminadas de acordo com o tempo estimado de ovulação e maturação dos oócitos citado por Johnston et al., (2001): onde as concentrações de progesterona entre 1,0 e 1,9 ng/mL, tem momento de ovulação estimado em até 48 horas após a coleta sanguínea para a análise, concentrações de progesterona entre 2,0 e 3,9 ng/mL, tem momento de ovulação estimado em até 24 horas e finalmente concentrações de progesterona entre 4,0 e 10,0 ng/mL indicam que a cadela já ovulou ou está ovulando. As inseminações foram realizadas em média 48 horas após suposta ovulação, a qual foi estimada de acordo com Johnston et al., (2001).

As dosagens de progesterona foram realizadas utilizando metodologia de radioimunoensaio, pelo laboratório “Endomed” em Jaboticabal.

3.3 Processamento do sêmen

3.3.1 Preparação do sêmen fresco

Foram utilizados três cães machos como doadores de sêmen, sendo que para cada inseminação foram utilizadas amostras seminais de cada macho alternativamente. Após coleta os ejaculados foram avaliados quanto ao volume, coloração, motilidade e vigor. As amostras permaneceram em banho maria, até que os cálculos de concentração espermática fossem realizados. O estudo da concentração foi feito utilizando a fórmula matemática descrita no anexo 04. Uma determinada quantidade da terceira fração foi usada como diluente até que a amostra final fosse aproximadamente 250×10^6 espermatozoides/mL (SILVA et al., 1995). A coleta de sêmen foi realizada simultaneamente ao início do procedimento cirúrgico. A amostra foi colocada em seringas estéreis de 1mL em número de duas e levadas rapidamente ao centro cirúrgico, minutos antes da inseminação intrauterina, quando o útero já estava fixado pelo cirurgião. Até o momento exato da inseminação as seringas contendo amostras seminais foram mantidas em banho-maria a 37°C.

3.3.2 Preparação do sêmen congelado

Após estudo de três protocolos de congelação, o protocolo 2, descrito por Martins (2005) foi escolhido por revelar melhores resultados após criopreservação das células espermáticas. Após análises, o ejaculado foi centrifugado a 800 g por 10 minutos (Centrífuga TDL80-2B®). O “pellet” obtido foi ressuspenso em meio diluente utilizado por PEÑA & LINDE-FORSBERG (2000) e modificado (descrito no anexo 03), sendo a concentração final de 80×10^6 espermatozoides/mL.

Após diluição, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, lacradas com álcool polivinílico e levada a um refrigerador, com temperatura constante de 5°C,

por um período de uma hora. As palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio, em suporte de metal, posicionada a 6,0 cm do nível de nitrogênio líquido, durante 20 minutos. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico.

O processo de descongelação foi realizado mergulhando as palhetas em banho-maria a 72°C por 8 segundos, utilizando termômetro para o controle exato da temperatura da água no interior do recipiente do banho-maria. Imediatamente após a descongelação, o sêmen da palheta foi diluído em 0,5 mL do meio utilizado (TRIS - ácido cítrico - OEP modificado, sem glicerol). As amostras foram colocadas em tubos plásticos de 0,5 mL, e mantidas em placa térmica a 37°C durante as análises pós-descongelação. Após descongelação as amostras de sêmen de cada palheta foram diluídas em 0,5 mL do meio utilizado TRIS - ácido cítrico sem glicerol, e foram preparadas duas seringas contendo 1 mL de amostra cada, e mantidas em placa térmica a 37°C .

3.4 Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia

3.4.1 Medicação Pré-Anestésica (MPA):

Como medicação pré-anestésica utilizou-se 2mg/kg de peso corpóreo de tramadol e 1 mg/kg de levopromazina, ambos por via intramuscular, numa mesma seringa, 15 minutos antes da indução.

3.4.2 Indução e Manutenção:

As cadelas foram induzidas à anestesia geral pela administração intravenosa de propofol na dose necessária para a perda do reflexo laringotraqueal em média 5mg/Kg de peso corpóreo. A intubação destes animais foi realizada com sonda de diâmetro adequado ao porte do cão, a qual foi conectada ao circuito anestésico com reinalação parcial de gases. A manutenção anestésica foi realizada utilizando gás isoflurano a concentração com 2,5% diluído em O₂ a 100%.

3.4.3 Fluidoterapia:

Durante todo o procedimento operatório, o animal recebeu fluidoterapia por via intravenosa, utilizando solução de Ringer Lactato (10mL/kg/h).

3.4.4 Procedimento cirúrgico:

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, em cefalodeclive, para o deslocamento das vísceras em favor da gravidade.

Foi realizada uma primeira punção abdominal na linha alba, aproximadamente 5 cm caudalmente à cicatriz umbilical, utilizando a agulha de Veres para insuflação abdominal com CO₂, até que a pressão interna atinja entre 8 e 10 mmHg. (Figura 1A). Em seguida, a agulha de Veres foi retirada e nesta mesma punção um trocarter de 7 mm, foi posicionado para passagem do endoscópio, acoplado à fonte de luz. Paralelamente a esta punção, aproximadamente a 3cm, foram realizadas tanto no lado esquerdo quanto direito, uma segunda e terceira punção, seguindo o mesmo quadrante. Estes portais foram destinados a passagem de pinças de manipulação e fixação uterina (Figura 1B).

Após posicionamento dos instrumentos, seguiu-se a inspeção da cavidade abdominal e localização dos cornos e corpo uterino (Figura 1C).

Os cornos uterinos foram apreendidos separadamente, e posicionados o mais próximo possível ao teto abdominal, logo um catéter com 22 gauges de diâmetro posicionados externamente foi inserido exatamente no ponto onde o corno uterino estava suspenso (terço cranial dos cornos uterinos). Ato contínuo, o cateter foi introduzido no lúmen dos cornos uterinos, para a injeção da amostra de sêmen (Figura 1D e 1E).

Após confirmação do posicionamento do catéter no lúmen uterino, seguiu-se a conexão deste à seringa contendo 1mL de amostra do sêmen, o processo foi repetido no outro corno uterino (Figura 1F).



Figura 01: A: Instalação do pneumoperitônio, sob inserção da agulha de Veres (1). B: Trocarte, endoscópio e fonte de luz (2) e cânula de CO₂ (3); Trocartes com pinças de manipulação (4); C: Localização do terço cranial do corno uterino e fixação utilizando pinça de manipulação; D: Posicionamento do corno uterino e inserção do catéter pela parede abdominal; E: Imagem interna do catéter inserido no lúmen uterino e injeção da amostra do sêmen; F: Imagem externa da inserção do catéter na parede abdominal, sendo este acoplado a seringa contendo amostra do sêmen. FCAV – Jaboticabal 2009.

Realizada as inseminações, seguiu-se a retirada de pinça de manipulação, endoscópio e trocartes, densinflação do abdome e síntese dos locais de punção, com pontos simples separados e fio de nylon 2-0. Como medicações pós-operatórias foram realizadas uma única aplicação de penicilina benzatina na dose de 40.000 UI/Kg, por via intramuscular; e morfina na dose de 0,05 mg/Kg por via subcutânea. Rifamicina foi aplicada sobre a ferida cirúrgica duas vezes ao dia, durante 7 dias.

3.4.4 Verificação da taxa de fecundação

Após 7 dias de inseminação, as fêmeas foram submetidas a ováriosalpingohisterectomia pela técnica convencional, descrita por Fossum et al. (1997).

O útero, ovários e tubas uterinas foram armazenados em reservatório contendo solução de NaCl 0,9%, em 37°C até o transporte ao laboratório de Biotecnologia da Reprodução da FCAV-Unesp/Jaboticabal. Seguiu-se o posicionamento do material sobre placa de Petri, sendo as tubas uterinas dissecadas da bolsa ovariana e seccionadas da porção uterina. Os cornos uterinos foram mantidos solução de PBS à 37°C. Procedeu-se a lavagem do lúmen das tubas uterinas, pela inserção de um catéter 18g, acoplados a uma seringa contendo solução de PBS também à 37°C. Procederam-se repetidas injeções, sob placa de Petri. O mesmo processo foi realizado para a lavagem do lúmen dos cornos uterinos.

Procedeu-se o exame da solução obtida na placa de Petri, sob lupa (LEICA WILD M48®) em fluxo de ar, para a verificação da presença dos embriões e confirmação da fecundação.

O embriões encontrados foram classificados de acordo com critérios relatados por Karja et al., (2002), sendo considerados embriões excelentes aqueles com simetria perfeita ou ligeiramente assimétricos; bons, os esféricos e com núcleo uniformemente enegrecido; como regulares ou ruins, aqueles totalmente ou parcialmente degenerados, com coloração clara ou contendo blastômeros rompidos.

Devido à dificuldade de visualização de estruturas intracélulares sob microscopia óptica comum nesta espécie, os embriões foram tratados com Hoescht (anexo 5) conforme descrito por Goodrowe et al., (1988) e iodeto de propídio. Após corados os embriões foram transferidos para lâminas, cobertos com lamínulas e analisados em microscópio de fluorescência, com filtro apropriado e aumento de 100x e 400x para contagem do número total de células, que apresentavam o núcleo em fluorescência de cor azul.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o sistema SAS. Para análises e comparações das concentrações séricas de progesterona, o teste “t-student” foi aplicado, e os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1 Resultados obtidos após inseminações utilizando sêmen fresco

A idade das cadelas apresentou média de $2,85 \pm 1,05$ anos (1,5 – 5,0 anos). Os resultados obtidos após inseminações utilizando sêmen fresco, bem como número de embriões encontrados, concentrações de progesterona, estão listados na Tabela 7. A concepção foi obtida em 7 de 10 cadelas inseminadas (70%).

Tabela 1: Idade, concentrações séricas de progesterona, suposto dia de Ovulação e IA, nas cadelas e número de embriões encontrados nas cadelas submetidas a inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia utilizando sêmen fresco. FCAV-Unesp Jaboticabal – 2009

Cadelas	Idade (anos)	P4 (ng/mL)/DA	Suposto DO	Dia da IA	Número de embriões
1	2	4,6/5°	5°	7°	2
2	3	1,4/5°	7°	9°	0
3	3	4,1/6°	6°	8°	0
4	3	1,1/4°	8°	10°	1
5	4	2,2/7°	8°	10°	1
6	3	1,5/4°	6°	8°	6
7	2	3,0/8°	9°	11°	1
8	5	3,0/7°	8°	10°	3
9	1.5	6,6/5°	4°	6°	5
10	2.0	3,4/6°	7°	9°	1

Sendo DA: Dia da análise; DO: Dia da ovulação; P4: Progesterona; IA: Inseminação artificial. FCAV-Unesp Jaboticabal- 2009

As características do sêmen utilizado nesse grupo revelaram 90% das células espermáticas móveis, vigor 5,0 e concentração $283,6 \times 10^6 \pm 44,9$ espermatozóides/mL.

O momento para a coleta sanguínea para análise de concentrações séricas de progesterona foi determinado pelo acompanhamento da citologia vaginal, ou seja

quando 90% das células do epitélio eram células superficiais.

Os valores obtidos para as concentrações séricas de progesterona estão descritos na Tabela 7.

Os concentrações de progesterona variaram entre 1,1 e 6,6 ng/mL, sendo média $3,09 \pm 1,69$. Para os concentrações de progesterona inferiores a 2,0 ng/mL novas coletas foram realizadas após 24h, até que os concentrações se apresentassem entre 2,0 e 10 ng/mL, e então o momento da inseminação pudesse ser planejado.

A taxa de concepção nas cadelas submetidas a este processo foi de 70%. A concentração máxima de progesterona foi apresentada pela cadela de número 9 (6.6 ng/mL), sendo inseminada 24 horas após coleta sanguínea, resultando em prenhez. Não houve correlação significativa com o intervalos entre dias após ovulação com a prenhez das cadelas.

O número de ovulações (corpos lúteos) variou entre 14 e 5 (média $11,2 \pm 3,11$). Foram encontrados um total de 20 embriões e os valores oscilaram entre 0 e 6, sendo média de 2 ± 2.05 por cadela. Quanto a localização embrionária, 90% dos embriões, foram encontrados no lavado da tuba uterina e 10% no de lúmen uterino. Os números, a localização e qualidade dos embriões de acordo com os lavados de tubas e cornos uterinos, bem como o número e localização de oócitos e corpos lúteos na superfície ovariana estão descritos na Tabela 8. O número de embriões encontrados não ultrapassou o número de corpos lúteos e supostas ovulações verificadas pela análise da superfície ovariana. Além disso o ovário que apresentou maior número de corpos lúteos, não correlacionou-se as suas respectivas tuba e corno uterino no que se refere a recuperação de maior número de embriões.

Tabela 2: Número de corpos lúteos e embriões; localização e qualidade embrionária, localização e quantidade oocitária após análise do lavado de tubas e cornos uterinos, de cadelas, 7 dias após inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia com sêmen fresco. FCAV-Unesp Jaboticabal – 2009.

Cadelas	N. CL	N. Embr.	Emb. T.U	Emb. C. U	N.Cel. Emb.	Emb. N / D	Ooc. T. U	Ooc. C. U
1	8D 6E	2	1D 1E	-	4	-	4D 0E	0D 2E
2	7D 5E	0	-	-	-	-	1D 1E	0D 0E
3	5D 7E	0	-	-	-	-	0D 3E	0D 0E
4	9D 5E	1	1D 0E	-	4	1/0	-	-
5	8D 6E	1	0D 1E	-	+4	1/0	-	-
6	5D 3E	6	4D 2E	-	8	4/2	-	-
7	2D 3E	1	-	1E	3	1/0	-	-
8	5D 5E	3	2D 1E	-	4	3/0	-	-
9	8D 6E	5	2D 3E	-	+4	4/1	-	-
10	5D 4E	1	-	1E	4	1/0	-	-

N. CL= Número de Corpos Lúteos, sendo E= lado esquerdo e D= lado direito; N. Embr.= Número de Embriões; Embr. T.U= Embriões nas Tubas Uterinas; Embr. C.U= Embriões nos Cornos Uterinos; N. Cel. Emb.= Número de Células Embrionárias; Emb. N/D= Embriões Normais/ Degenerados; Ooc. T. U= Oócitos na Tuba Uterina; Ooc. C.U= Oócitos no Cornos Uterinos.

A maioria dos embriões foram classificados como excelentes, apresentando morfologia normal, e se encontravam no início da divisão celular apresentando 2, 4 ou 8 células (Figura 2).

A coloração de Hoescht não possibilitou a contagem exata do número de células. Somente 3 embriões se encontravam em estado de degeneração com defeitos na zona pelúcida (Figura 3).

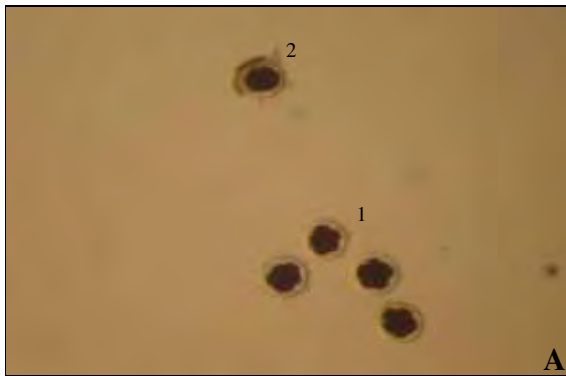


Figura 02: Embriões e oócitos encontrados no lavado de tubas uterinas após 7 dias de inseminação intrauterina utilizando sêmen fresco. A: 1-embriões normais; 2- embrião degenerado; B: embrião com 3 células; C: embrião com 4 células; D: Oócitos encontrados no lavado de tubas uterinas.

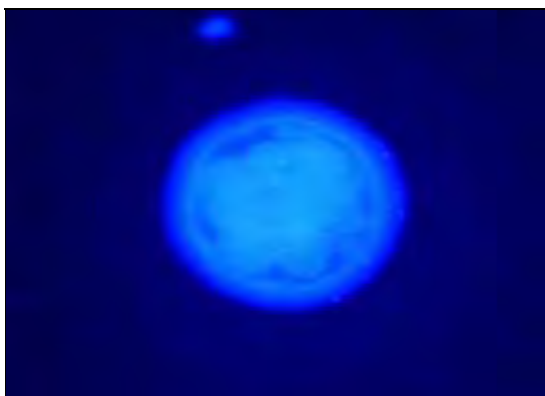


Figura 03: Coloração Hoescht em embrião com mais de 4 células no lavado de tubas uterinas após 7 dias de inseminação intrauterina utilizando sêmen fresco.

4.2 Resultados obtidos após inseminações utilizando sêmen descongelado

A idade das cadelas apresentou média de $2,5 \pm 1,49$ anos (0,5 - 5 anos). Os resultados obtidos após inseminações utilizando sêmen descongelado, bem como idade, concentrações séricas de progesterona, suposto dia de ovulação, IA e número de embriões, estão descritos na Tabela 9. A concepção foi obtida em 5 de 10 cadelas inseminadas (50%).

Tabela 3: Idade, concentrações séricas de progesterona, suposto dia de Ovulação e IA, nas cadelas e número de embriões encontrados nas cadelas submetidas a inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia utilizando sêmen descongelado. FCAV-Unesp / Jaboticabal – 2009.

Cadelas	Idade (anos)	P4 (ng/mL)/DA	Suposto DO	Dia da IA	Número de embriões
1	0,5	1,0/6°	8°	10°	0
2	2	1,5/5°	7°	9°	1
3	4	2,4/8°	9°	11°	0
4	1	3,3/4°	5°	7°	2
5	4	4,5/5°	5°	7°	1
6	2	2,8/5°	6°	8°	0
7	2,5	3,1/6°	7°	9°	2
8	3	3,9/4°	5°	7°	0
9	5	4,6/5°	5°	7°	4
10	1	1,8/4°	6°	8°	0

Sendo DA: Dia da análise; DO: Dia da ovulação; P4: Progesterona; IA: Inseminação artificial. FCAV-UNESP Jaboticabal – 2009.

As avaliações de citologia vaginal nas cadelas a serem inseminadas com sêmen descongelado seguiram as mesmas observações obtidas no grupo de cadelas inseminadas com sêmen fresco, sendo a primeira coleta sanguínea para análise das concentrações séricas de progesterona realizada quando 90% das células do epitélio apresentaram-se superficiais anucleadas.

As inseminações foram realizadas em média 48 horas após ovulação, estimada

de acordo com as concentrações séricas de progesterona, conforme Johnston et al. (2001), descrito anteriormente.

Os concentrações de progesterona variaram entre 1,0 e 4,6 ng/mL, sendo média $2,89 \pm 1,23$ ng/mL. Para os concentrações de progesterona inferiores a 2,0 ng/mL novas observações foram realizadas após 48h, até que os concentrações se apresentassem entre 2,0 e 10 ng/mL, e então as inseminações foram realizadas de acordo com estimado tempo de ovulação e maturação dos oócitos citado por Johnston (2001).

A taxa de concepção nas cadelas submetidas a este processo foi de 50%. Nenhuma cadela apresentou concentrações superiores a 4,6 ng/mL. Não houve correlação significativa com o intervalos entre dia após ovulação e prenhez das cadelas.

O número de ovulações variou entre 14 e 5 (média $9,3 \pm 2,4$) e foram encontrados um total de 10 embriões, com números variando entre 0 e 4, sendo média de $2 \pm 2,05$ por cadela. Sendo 90% dos embriões, encontrados no lavado da tuba uterina e 10% no do lúmen uterino e os números, a localização e qualidade dos embriões de acordo com os lavados de tubas e cornos uterinos, bem como o número e localização de oócitos, corpos lúteos na superfície ovariana encontrados estão descritos na Tabela 10.

Tabela 4: Número de corpos lúteos e embriões; localização e qualidade embrionária, localização e quantidade oocitária após análise do lavado de tubas e cornos uterinos, de cadelas, 7 dias após inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia utilizando sêmen descongelado. FCAV-Unesp Jaboticabal – 2009.

Cadelas	N. CL	N. Embr.	Emb. T.U	Emb. C. U	N.Cel.Emb.	Emb. N / D	Ooc. T. U	Ooc. C. U
Totais								
1	7D 3E	0	-	-	-	-	4D 0E	0D 2E
2	5D 5E	1	1D 0E	-	4	1/0	-	-
3	4D 3E	0	-	-	-	-	2D0E	0D1E
4	7D 4E	2	1D 1E	-	4	2/0	-	-
5	6D 4E	1	0D 1E	-	2	1/0	-	-
6	6D 3E	0	-	-	-	-	0D3E	-
7	2D 3E	2	2D 0E	-	4	2/0	-	-
8	5D 3E	0	-	-	-	-	2D1E	1D0E
9	9D 5E	4	2D 1E	1D	4	3/1	-	-
10	5D 4E	0	-	-	-	-	1D0E	-

N. CL= Número de Corpos Lúteos, sendo E= lado esquerdo e D= lado direito; N. Embr.= Número de Embriões; Embr. T.U= Embriões nas Tubas Uterinas; Embr. C.U= Embriões nos Cornos Uterinos; N. Cel. Emb.= Número de Células Embrionárias; Emb. N/D= Embriões Normais/ Degenerados; Ooc. T. U= Oócitos na Tuba Uterina; Ooc. C.U= Oócitos no Cornos Uterinos.

O número de embriões encontrados não ultrapassou o número de corpos lúteos e supostas ovulações verificadas na superfície ovariana, e o ovário que apresentou maior número de corpos lúteos, não apresentou correlação significativa com a respectiva tuba e corno uterino onde foram encontrados maior número de embriões.

Os embriões foram classificados como excelentes e estes se encontravam em divisão celular apresentando 2, 4 ou 8 células, conforme Figura 4B, 4C, 4D, 4E. A coloração de Hoescht e iodeto de propídio aplicada aos embriões provenientes deste grupo também não possibilitou a contagem exata do número de células, Figuras 4A e 4F.

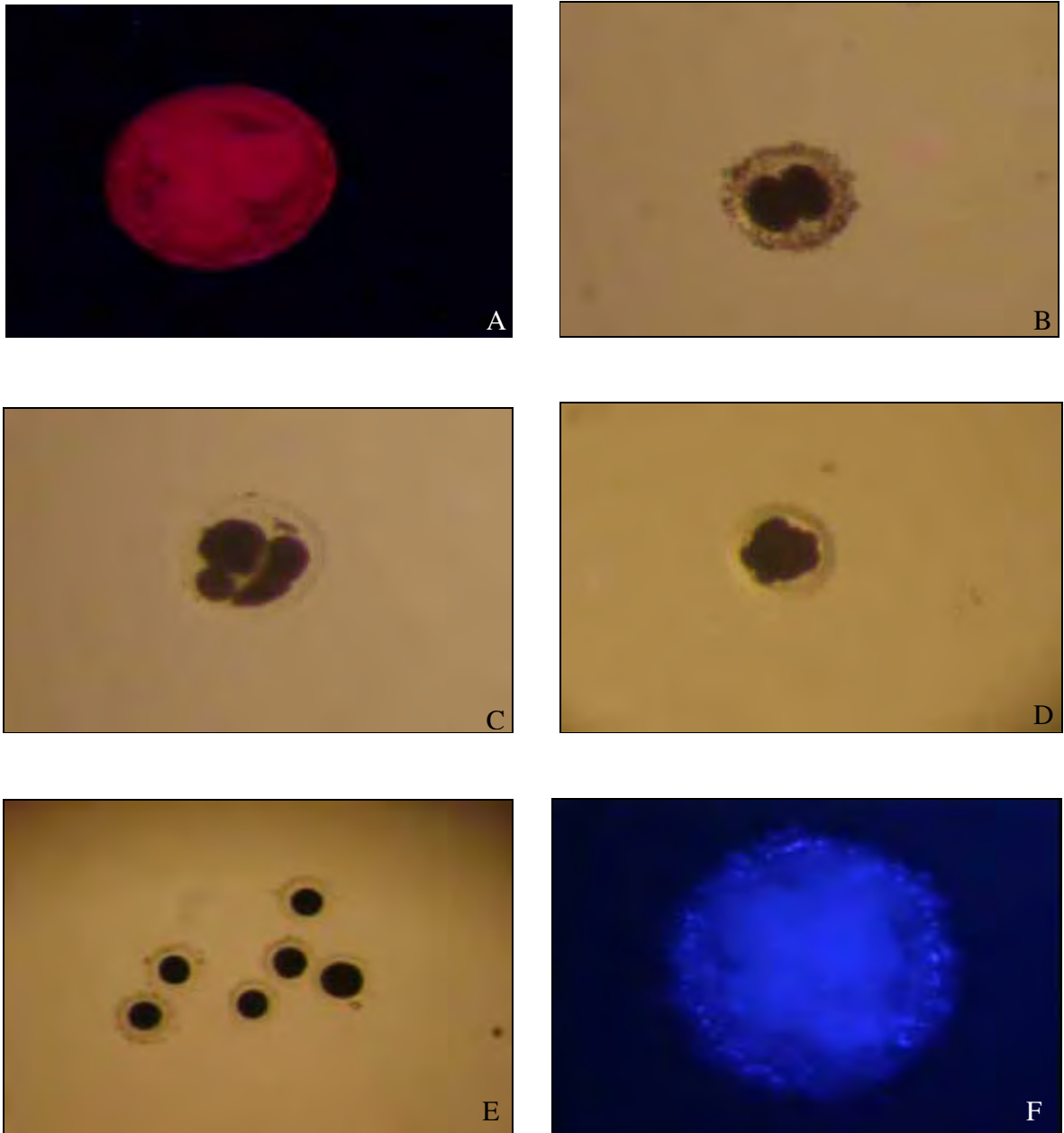


Figura 04: Embrião e oócitos encontrados no lavado de tubas uterinas após 7 dias de inseminação intrauterina utilizando semen descongelado. A: Embrião de 3 células (Coloração com iodeto de propídio); B: Embrião de 2 células; C: Embrião de 4 células; D: Embrião com mais de 4 células; E: oócitos não fecundados; F: Coloração Hoescht em embrião com mais de 4 células. FCAV-Jaboticabal (2009).

V. DISCUSSÃO

As concentrações séricas de progesterona aliadas as informações obtidas pelos esfregaços vaginais, nos permitiram estimar o período provável da ovulação em todos os animais, procedimentos também referidos por Tsutsui et al., (2000); Thomassen & Farstad (2009). Particularmente no que diz respeito aos valores da progesterona por nós obtidos, pudemos verificar que eles estavam de acordo com Concannon et al., (1989), o que nos permite inferir ser este parâmetro, concentração de P4 o melhor e mais seguro método indireto de estimativa do fenômeno biológico de ovulação na espécie canina. Entretanto nos parece importante destacar que existe uma grande variabilidade individual dos animais relatada por Silva (1995), o que pode levar a um comprometimento em se estimar o momento ideal da ovulação e muito provavelmente em decorrência desta particularidade tenhamos tido 30% e 50% de fêmeas que não conceberam, respectivamente, no grupo fresco e congelado.

Devemos considerar ainda, as metodologias utilizadas para a mensuração das concentrações séricas de progesterona com o radioimunoensaio ou Enzyme linked Immunosorbent (ELISA) relatados por Johnston et al., (2001), podem resultar em diferentes valores e interpretações de acordo com o tipo de kit utilizado, além do que diversos autores consultados omitem o procedimento utilizado para identificar as concentrações deste hormônio.

De outra parte, existe grande número de variáveis que devem ser consideradas e dentre estas se faz prudente destacar o momento ideal da inseminação a ser estimada, considerando a viabilidade dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea. Neste local, eles sofrem capacitação para após estarem aptos a fertilizar o oócito (PETRUNKINA et al., 2003). Este tempo pode obter variações principalmente no caso da IAIU com sêmen descongelado. Cormier e Bailey (2003) relatam o termo criocapacitação, explicando o fato de que procedimentos de criopreservação induzem alterações no espermatozoide, similares à da capacitação.

Porém cabe destacar que o sêmen utilizado sempre se enquadrou dentro dos parâmetros recomendados para a IA e acreditamos que esse tenha sido um dos fatores

responsável por índices de fertilização dentro daqueles relatados por Theret et al., (1987) e Tsutsui et al., (1988) entre 25-89%.

Sobre o uso da técnica de videolaparoscopia para a IAIU em cães, sabe-se que ainda é bastante restrita, citada apenas por Silva et al., (1995b); sendo que a laparotomia convencional tem sido método de eleição para IAIU como descreveu Hori et al., (2005). Observou-se no presente estudo a facilidade em visualizar a bolsa ovariana e cornos uterinos, esse fato favoreceu o posicionamento angular do corno contra a parede abdominal, e a introdução do catéter em seu terço proximal. Ademais, por ser procedimento cirúrgico pouco invasivo os animais apresentaram rápida recuperação pós cirúrgica, discreta e fulgaz manifestação de incômodo abdominal, período de pós operatório sem nenhum tipo de intercorrência. Os efeitos benéficos da laparoscopia foram também descritos por Alves (2005) e Malm (2003) e nos permitem recomendar que este procedimento seja utilizado em espécies de canídeos com interesse de preservação.

Com relação as taxas de fecundação para sêmen fresco e congelado, obtivemos valores de 70% e 50% respectivamente, e com base na literatura consultada esta informação é a primeira obtida com inseminação artificial intrauterina realizada por laparoscopia em um trabalho desenvolvido em nosso país; todas as demais resultam de pesquisas realizadas no exterior ainda que tenha havido a participação de pesquisadores brasileiros.

Nossos dados de fecundação estão próximos do intervalo citado nas descrições feitas tanto para IA com sêmen fresco, sendo a taxa entre 25-89%, descrito por Theret et al., (1987) e descongelado, entre 60-100% de acordo com Silva e Verstegen (1995) e Tsutsui et al (2000), independente dos métodos utilizados. Contudo, se faz fundamental e de grande importância considerar alguns aspectos que provavelmente interferiram nas diferenças encontradas por nós quando comparadas as descritas na literatura.

Assim, um aspecto que nos parece de absoluta relevância é a variabilidade biológica individual, especialmente a atividade hormonal fator que em nossa opinião interferiu de modo determinante na ovulação e na identificação deste fenômeno,

comprometendo as taxas de fecundação por nós obtidas. Esta condição também foi abordada por Guérin (1998). Complementarmente há de se mencionar, nesta espécie, outra condição bastante peculiar que é o período de maturação dos oócitos o qual pode ocorrer entre 36 e 50 horas após ovulação segundo Concannon et al., (1977), 48 e 72 horas (TSUTSUI & SHIMIZU, 1975). Já Reynaud et al., (2005) relatam oócitos maduros (MII) após 54 horas. Observando portanto esta variabilidade citada podemos inferir que este intervalo de tempo pode interferiu na taxa de fecundação do presente estudo.

Quanto ao local de depósito seminal a utilização da IAIU bilateral e foi opção feita, objetivando a diminuição de oócitos não fecundados, especialmente no grupo utilizando sêmen descongelado. Essa metodologia foi preconizada mesmo em se tendo conhecimento da migração de espermatozoides depositados unicamente em um dos cornos para o adjacente (Tsutsui et al., 1989a). Optou-se também pelo uso da inseminação única como recomendada por Linde-Forsberg et al., (1999) após prévia investigação da concentração sérica de P4. Portanto, nós julgamos que os dois fatores supracitados: local de deposição e número de inseminações, correlacionam-se as taxas de fecundação.

Optamos para realizar a deposição do sêmen intrauterinamente no terço proximal dos cornos uterinos, pela maior proximidade do local de fertilização, em especial por estarmos utilizando em um dos grupos experimentais sêmen descongelado que normalmente possui qualidade inferior ao fresco. Esta opção é corroborada pelo trabalho de Oettlé (1993) onde comentou ser a morfologia espermática diretamente relacionadas as taxas de fertilização, e que a integridade acrossomal é fundamental neste processo, pois pode ser alterada durante a congelação e descongelação.

No que se refere ao procedimento cirúrgico é factível, ainda que não tenhamos delineado esta investigação, que a instalação do pneumoperitônio com CO₂, procedimento obrigatório neste tipo de intervenção, pode ter interferido na dinâmica circulatória uterina, uma vez que é relatado a alteração hemogasométrica (Lloréns et al., 2009). Este fato poderia corroborar indiretamente com as baixas taxas de concepção, porém não há na literatura referência a este tipo de avaliação.

Aduzindo aos comentários prévios com relação ao sêmen descongelado podemos comentar ainda outras condições interessantes as quais em nossa opinião são merecedoras de destaque.

De acordo com Kim et al., (2007), o contato do oócito com o meio diluente utilizado na congelação do sêmen, pode provocar a morte celular e inviabilizar a fecundação. E embora não se tenha preconizado aqui esta investigação, pode-se inferir que tal processo ocorreu; ainda que se tenha utilizado diluente TRIS+ÁCIDO CITRICO+ OEP MODIFICADO, que promove boas condições aos espermatozóides após descongelação.

Conforme mencionado, a taxa de concepção de 50%, com dose inseminante de 80×10^6 espermatozóides/mL, foi semelhante ao descrito por Linde-Forsberg et al., (1991). Estes obtiveram gestação em 57,9% das cadelas, utilizando uma concentração de $100-400 \times 10^6$ espermatozóides após descongelação. Maiores taxas estão descritas na literatura sendo que Tsutsui et al., (2000) observaram 90% de taxa de concepção ao realizarem IAIU com 100×10^6 espermatozóides em 10 cães. Sendo 71% (Cremonesi et al., 2005), 60% nos animais inseminados com sêmen contendo Laiciphos e Tes/Tris, e 100% com sêmen estendido com Biociphos (SILVA & VERSTEGEN, 1995a) e 75% por Thomassen et al., (2006).

Kim et al., (2007) realizaram IAIU em cadelas, no terceiro dia estimado após ovulação, utilizando sêmen descongelado, obtendo 100% de prenhez, utilizando sêmen em concentração de 5×10^7 espermatozóides, 80% com 5×10^6 espermatozóides e 0% com 5×10^5 espermatozóides. Estes resultados revelaram alta taxa de concepção com menor número de espermatozóides em comparação com o protocolo por nós utilizado e acreditamos ser uma provável explicação para este fato que a inseminação dos animais no segundo dia pós ovulação estimada, reduziu a possibilidade dos espermatozóides fecundarem oócitos maturados após esse período.

O número total de corpos lúteos não correspondeu a somatória de embriões e oócitos encontrados, tendo havido uma perda de 83% e 90% respectivamente para o grupo de sêmen fresco e descongelado. Acreditamos que isto tenha ocorrido pelo processos de manipulação para dissecação e lavagem destas estruturas. A

possibilidade de absorção embrionária na tuba e útero descrita por Allen (1992), não foi levada em consideração devido ao período precoce de avaliação.

A possibilidade de deixar as cadelas completarem a gestação foi por nós levada em consideração, pois assim poderíamos avaliar as taxas de gestação, realizando acompanhamento ultrassonográfico periodicamente até o nascimento. Infelizmente esta possibilidade foi descartada pela não concordância dos proprietários.

VI. CONCLUSÃO

- As taxas de concepção após IAIU por videolaparoscopia foi de 70% utilizando sêmen fresco e 50% com sêmen descongelado.

- O número de corpos lúteos ovarianos foi diferente da somatória do número de embriões e oócitos encontrados.

- O maior número de embriões encontrados se localizavam nas tubas uterinas após 7 dias de inseminação.

- O método de lavagem do lúmen das tubas e cornos uterinos parece ser a maior causa das perdas embrionárias.

- A dosagem de progesterona e a colpocitologia ofereceu diagnóstico seguro na estimativa do momento de ovulação.

Sendo assim, este procedimento sugere bons resultados na recuperação dos canídeos selvagens em extinção.

VI. REFERÊNCIAS

ALLEN, W.E. **Fertility and Obstetrics in the Dog**. Blackmell Scientific Publications (Oxford), p.116, 1992.

ALVES, A.E. **Avaliação dos parâmetros fisiológicos, comportamentais e laboratoriais de fêmeas felinas (*Felis catus-Linnaeus 1758*) submetidos a ovariectomia por videolaparoscopia e abordagem convencional**. Tese mestrado. Universidade Estadual Paulista, *campus* de Jaboticabal/SP. Jaboticabal 2005. 86p

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

CONCANNON, P.W, HANSEL, W, VISEK, W.J. The ovarian cycle of the bitch; plasma estrogen, LH and progesterone. **Biology of Reproduction**, v.13, p.112-21, 1975.

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

CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in dog. **Journal Reproduction and Fertility** Suppl. 39, p. 3-25, 1989.

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

CORMIER, N.; BAILEY, J.L. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 177-185, 2003.

CREMONESI, F.; SALAMON, L.; GROPPETTI, D.; PECILE, P. Results of a single transcervical endoscopic insemination using frozen semen in the bitch. **Veterinary research communications**, n. 29, suppl 2, p. 187-189, 2005.

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

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Canine and feline endocrinology and reproduction. **W. B. Saunders Company** (Philadelphia), 1996.

FONTBONNE, A.; BADINAND, F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 47, p. 325-327, 1993.

FOSSUM, T. W. et al., Small Animal Surgery. **Editora Mosby** (St Louis, Missouri), 1997.

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

HOLST, P. A.; PHEMISTER, R. D. The prenatal development of the dog: preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v. 5, p.194 – 206, 1971.

HORI, T.; HAGIUDA, K.; ENDO, S.; HAYAMA, A.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Unilateral intrauterine insemination with cryopreserved caudal epididymal sperm recovered from refrigerated canine epididymides. **Journal of Veterinary Medicine Science**. n. 67, v. 11, p. 1141-7, 2005.

JEFFCOATE, I.A. & LINDSAY, F.E.F. Ovulation detection and timing of insemination base don hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. **Journal of Reproduction and fertility, Suppl.**, v. 39, p. 277-287, 1989.

JEWGENOW, K.; PENFOLD, L.M.; MEYER, H.H.; WILDT, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and fertility**, v. 112, p. 39-47, 1998.

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

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

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.21, n. 3, 467-485, 1991.

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.

LINDSAY, F.E.F. The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy, **Journal of Small Animal Practice**, v. 24, p.1-15, 1983.

LLORÉNS, J.; BALLESTER, M.; TUSMAN, G.; BLASCO, L.; GARCIA-FERNANDEZ, J.; JOVER, J.L.; BELDA, F.J. Adaptive support ventilation for gynaecological laparoscopic

surgery on Trendelenburg position:bringing ICU modes of mechanical ventilation to the operating room. **European Journal of Anaesthesiolog**, v. 26, n. 2, p. 135-9, 2009.

MALM, C. **Ovário-histerectomia – Estudo experimental comparativo entre as abordagens laparoscópicas e aberta na espécie canina**.2003.165f. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

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

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

PAPA, F. O. et al., Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Sthyphnodendrum barbatiman*). In: CONGRESSO DE BIOLOGIA MOLECULAR 5., 1986, Rio de Janeiro. **Anais...**, p. 86.

PEÑA, A., LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-75, 2000.

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

PETRUNKINA, A.M.; SIMON, K.; GÜNZEL-APEL, A.R.; TÖPFER-PETERSON, E. Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous oviductal epithelial cells. **Reproduction Domestic Animal**, v. 38, p. 455–463, 2003.

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

REYNAUD, K; FONTBONNE, A; MARSELOO, N; THOUMIRE, S; CHEBROUT, M; VIARIS DE LESEGNO, C; S CHASTANT-MAILLARD, C. *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Society for Reproduction and Fertility**. 2005. (on line) www.reproduction-online.org, acesso em 24/02/2009.

SAHA, S.; SHIMIZU. M.; GESHI. M.; IZAIKE, Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 63, p. 27-39, 2000.

SCHUTTE, A.P. Canine Vaginal Citology-II. Cyclic Changes. **Journal of Small Animal Practice**, v. 8, p. 307-311, 1967.

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

SEAGER, S. W. J.; PLATZ, C. C. Artificial insemination and frozen semen in the dog, **Veterinary Clinics of North America**, v. 7, p. 757-764, 1977.

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

SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; SNAPS, F.; VERSTEGEN, J. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. **Theriogenology**, n. 43, p. 615-623, 1995b.

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

SILVA, T.L.; REIS. A.; HEWITT. C.; ROSEIRO, J.C. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Bol Biotechnology**, p. 32-40, 2001.

SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Uso da sonda de Osiris na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Rottweiler. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p. 147-149, 2002a.

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

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

STORNELLI, M.A.; STORNELLI, M.C.; ARAUZ, M.S.; SAVIGNONE, C.A.; GARCÍA, M. DE LA SOTA, R.L. Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado refrigerado a 4 °C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 468-470, 2001.

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

TSUTSUI, T.; SHIMIZU, T. Studies on the reproduction in the dog. IV. On the fertile period of ovum after ovulation. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, n. 21, p. 65–69, 1975.

TSUTSUI, T.; TEZUKA, T.; SHIMIZU, T.; MURAO, I.; KAWAKAMI, E.; OGASA, A. Artificial insemination with fresh semen in Beagles bitches. **Japanese Journal Veterinary Science**, n. 50, p. 193-198, 1988.

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

TSUTSUI, T.; SHIMIZU, T.; OHARA, N.; SHIBA, Y.; HIRONAKA, T.; ORIMA, H.; OGASA, A. Relationship between the number of sperms and rate implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn. **Japanese Journal Veterinary Science**, n. 51, p. 257-263, 1989a.

TSUTSUI, T.; KAWAKAMI, E.; MURAO, I.; OGASA, A. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 51, p. 560-565, 1989b.

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. **Journal Veterinary Medical Science**, n. 62, p. 603-606, 2000.

TSUTSUI, T.; HORI, T.; YAMADA, A.; KIRIHARA, N.; KAWAKAMI, E. Intratubal insemination with fresh semen in dogs. **Journal Veterinary Medical Science**, n. 65, v. 5, p. 659-661, 2003.

TSUTSUI, T.; HORI, T.; ENDO, S.; HAYAMA, A.; KAWAKAMI, E. Intrauterine transfer of early canine embryos. **Theriogenology**, n. 66, p. 1703-1705, 2006.

THERET, M.; TREIZE, G.; DUMON, C. Artificial insemination of the bitch, using the Osiris gun. **Mod Veterinary Practice**, n. 68, p. 229-230, 1987.

THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, K.; ANDERSEN BERG, K.; FARSTAD, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. **Theriogenology**, n. 66, p. 1645-1650, 2006.

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

UCHOA, D.C.; SILVA, A.R.; SILVA, T.F.P.; SILVA, L.D.M. Inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Bassethound utilizando a Sonda de Osiris®.

Revista Brasileira de Reprodução Animal, n. 25, v. 3, p. 371-373, 2001.

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

WILDT, D. E., SEAGER, S. W. J., CHAKRABORTY, P. K. Behavioral, ovarian and endocrine relationships in pubertal bitch. **J. Anim. Sci.** v. 53, p. 182-191, 1981.

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

ANEXOS

Anexo 01. Escala de avaliação de vigor espermático (0 à 5) segundo (Christiansen, 1988).

Vigor 0=sem movimento;

Vigor 1=vivo sem movimento progressivo;

Vigor 2= movimento progressivo lento;

Vigor 3=movimento progressivo moderado;

Vigor 4=movimento progressivo moderado;

Vigor 5= movimento progressivo muito rápido

Anexo 02. Constituição do tampão TRIS, utilizado no protocolo 1

- 3,028g de Tris-hidroximetil-aminometano,

- 1,78g de ácido cítrico monohidratado

- 1,25 de D-Frutose

Todos estes ingredientes dissolvidos em 100 mL de água ultrapura.

- Glicerol 6%

Anexo 03. Meio diluente utilizado no protocolo 2 (Peña et al., 2000) modificado por Martins (2005).

- Tris 2,4 g

- Ácido cítrico 1,4 g

- Glicose 0,8 g

- Gema de ovo 20%

- Glicerol 7%

- OEP 1%

- Amicacina (0,02%)

Anexo 04. Fórmula para calcular a concentração do sêmen segundo KRAUSE (1966)

A

$$1/B \times N/25 \times 1/10$$

A= n° de espermatozoides contados

B= fator de diluição

N= n° de quadrados contados

1/10= altura da câmara

Anexo 05: Coloração por Hoescht (Wall et al., 1985)

- 0,1 Trypan Blue (Sigma) durante 1 à 2 minutos, incubados em 0,09 mg/mL H342 durante 15 minutos a 23°C. Os embriões foram então levados a centrifugação (15.000 x g) durante 3 minutos.