

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL: A FERTILIDADE DO SÊMEN CANINO
CONGELADO, COMPARADA À DO SÊMEN CANINO FRESCO**

Cássio Simioni dos Santos

**Porto Alegre
2012/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL: A FERTILIDADE DO SÊMEN CANINO
CONGELADO, COMPARADA À DO SÊMEN CANINO FRESCO: ESTUDO
RETROSPECTIVO**

**Autor: Cássio Simioni dos Santos
Orientadora: Prof. Enefer Rosana Oberst
Co-orientadora: Méd. Vet. Mariana Gobbato Neuls**

**Monografia apresentada à
Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito parcial
para obtenção de Graduação em Medicina Veterinária**

**PORTO ALEGRE
2012/2**

RESUMO

A inseminação artificial (IA) utilizando sêmen congelado é uma ferramenta importante na reprodução de cães, visa o melhoramento genético e melhor aproveitamento do reprodutor. Por isso, este trabalho analisou o histórico de dois anos (2010-2011), de uma clínica veterinária especializada em reprodução canina na cidade de Porto Alegre, com o objetivo de determinar a taxa de gestação de cadelas, utilizando sêmen congelado, em comparação à utilização de sêmen fresco. Neste período foram realizadas 33 IA por laparotomia, 14 com sêmen canino congelado e 19 com sêmen canino fresco e. Os resultados demonstraram uma taxa de gestação de 78,6% com a utilização de sêmen congelado, e uma taxa de gestação de 94,7% com a utilização do sêmen fresco.

Palavras chave: inseminação artificial, sêmen congelado, cães.

ABSTRACT

Artificial insemination (AI) using frozen semen is an important tool in breeding dogs, genetic improvement aims a better use of the dog breeder. Therefore, this study examined the history of two years (2010-2011), a vet specializing in reproduction in dogs in the city of Porto Alegre, in order to determine the rate of pregnancy in bitches using frozen semen, compared to use of fresh semen. During this period there were 33 IA laparotomy, 14 with frozen canine semen and 19 with canine semen and fresh. The results showed a pregnancy rate of 78.6% with the use of frozen semen, and a pregnancy rate of 94.7% with the use of fresh semen.

Key words: artificial insemination, frozen semen, dogs.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	3
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	Coleta, Avaliação e Tecnologia do Sêmen Canino.....	4
2.2	Momento da IA.....	7
3	OBJETIVOS.....	10
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
	REFERÊNCIAS.....	16

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) por via intrauterina (IAIU), que consiste na deposição do sêmen diretamente dentro do útero é indicada principalmente para casos em que a via vaginal pode comprometer os resultados da IA, como por exemplo, na utilização de um sêmen congelado com baixa qualidade pós-descongelamento (SILVA, 1995). Segundo Johnston *et al.* (2001), a IAIU pode ainda ser utilizada como uma alternativa para melhorar as taxas de fertilidade de machos oligospermicos, ou seja, com um baixo número de espermatozoides no ejaculado. Várias abordagens têm sido realizadas com o intuito de se desenvolver técnicas para a IAIU, transcervical ou através de procedimentos cirúrgicos transabdominais, como a laparotomia e laparoscopia.

A IA com sêmen canino fresco, contendo um número adequado de espermatozoides, proporciona resultados de fertilidade similares àqueles obtidos pela monta natural (Pereira *et al.*, 2001; Uchoa *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002a), a qual, segundo Daurio *et al.* (1987), apresenta eficiência em torno de 85% nesta espécie. Porém, os resultados de IA com sêmen congelado, ainda são bastante heterogêneos (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989; SILVA, 1995; SANTOS, 2004). Esses resultados são devido a fatores relacionados, tanto aos machos quanto as fêmeas. Nas fêmeas, um dos maiores problemas relacionados à técnica de IA é a dificuldade na detecção do momento ideal para IA, juntamente com a dificuldade na transposição cervical. Outra particularidade importante da fisiologia da fêmea canina que afeta a fertilidade do sêmen congelado é o fato das cadelas liberam ovócitos imaturos, sendo necessário dois ou três dias para sua maturação completa e fecundação, criando dificuldades para a identificação segura do momento da ovulação e da inseminação artificial.

As taxas de concepção observadas após IA com sêmen congelado são sensivelmente inferiores às obtidas com sêmen fresco (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989). Esse fato é provavelmente devido à viabilidade e fecundidade reduzida dos espermatozoides congelados. Isso pode ser devido ao processo de congelamento e descongelamento, à qualidade do sêmen após congelamento, aos tipos de meios utilizados, dentre outros fatores. De fato, segundo Concannon e Battista (1989) e Fontbonne e Badinand (1993), a viabilidade do espermatozoide após descongelamento pode variar de 12 a 24 horas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Coleta, Avaliação e Tecnologia do Sêmen Canino

Diversos métodos foram descritos para a coleta de sêmen na espécie canina, tais como: massagem digital; uso de vagina artificial; vibrador elétrico e eletroejaculação (HARROP, 1955; CHRISTIANSEN, 1988). A massagem digital consiste em massagear o prepúcio do cão na altura do bulbo cavernoso peniano, até que o animal atinja a ereção parcial. O prepúcio é então retraído para trás do bulbo e o pênis é comprimido com moderada pressão, posteriormente ao bulbo (SEAGER E FLETCHER, 1972; CHRISTIANSEN, 1988). O ejaculado é coletado fracionadamente com o auxílio de um funil de vidro ou plástico que desemboca em tubos graduados (GILL *et al.*, 1970), devendo-se evitar o contato direto entre o pênis e o material de coleta (SEAGERE FLETCHER, 1972). Segundo Boucher *et al.* (1958), a massagem digital permite a obtenção de um sêmen de qualidade superior ao obtido por vagina artificial, sendo que o primeiro método é especialmente confiável mesmo para cães não condicionados. Althouse *et al.* (1991) observaram que a exposição do sêmen fresco às luvas de látex e/ou vinil causa um imediato decréscimo na motilidade espermática, devendo-se evitar tal contato durante a massagem digital, que é hoje o método de eleição para a coleta do sêmen nesta espécie.

A análise padrão da fração espermática do ejaculado é rotineiramente utilizada para avaliar a qualidade do sêmen canino, incluindo a observação do volume, coloração, viscosidade, pH e osmolaridade. A avaliação microscópica do sêmen inclui a observação da concentração e morfologia espermática, bem como a avaliação subjetiva da porcentagem de espermatozóides móveis na amostra (motilidade) e a qualidade dessa motilidade, denominada de vigor (CHRISTIANSEN, 1988; FELDMAN E NELSON, 1996; JOHNSTON ET AL., 2001). Vale salientar que diversos métodos de análise seminal computadorizada (CASA) já foram validados para a espécie canina, entre eles destacam-se o Analisador de Qualidade Espermática (SQA) e o Hamilton Thorn (HTR), os quais permitem uma avaliação objetiva e precisa dos parâmetros microscópicos seminais (IGUER-OUADA, 2001).

Embora a relação entre a motilidade e a capacidade fecundante do espermatozóide canino não esteja totalmente elucidada, a maioria dos pesquisadores ainda utiliza a motilidade como o principal parâmetro para a avaliação do sêmen canino

(IVANOVA-KICHEVA *et al.*, 1997). Assim, uma amostra normal de sêmen deve exibir uma motilidade mínima de 70% (CHRISTIANSEN, 1988). Em seguida, deve-se avaliar o vigor espermático, que é a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozóides móveis, observada em escala que varia de 0 a 5 (PLATZ E SEAGER, 1977). Em 1993, Oettlé demonstrou que a morfologia espermática normal em cães estaria melhor correlacionada com a fertilidade após IA, do que a simples observação da motilidade espermática, sendo que haveria um decréscimo nessa fertilidade caso fossem utilizadas amostras de sêmen apresentando morfologia espermática normal inferior a 60%.

Diversos outros métodos foram descritos para a avaliação da qualidade seminal. Dentre estes, podem ser destacados o teste de termorresistência (STRÖM *et al.*, 1997), o teste hipo-osmótico (ENGLAND E PLUMMER, 1993), o teste de capacitação e reação acrossômica *in vitro* (HEWITT E ENGLAND, 1998), a análise ultra-estrutural (RODRIGUES-MARTINEZ *et al.*, 1993) e os testes de incubação com oócitos homólogos ou heterólogos (Mayenco-Aguirre e Perez-Cortéz, 1998; Metcalf, 1999; Larsson e Rodrigues-Martinez, 2000, Mastromonaco *et al.*, 2002).

Durante o procedimento de congelação, muitos fatores podem influenciar a qualidade e a viabilidade do sêmen, incluindo a técnica de colheita de sêmen, o meio diluente, a concentração final de espermatozóides, o processamento do sêmen, a combinação do meio diluente e as curvas de congelação durante a criopreservação, e o método de descongelação (PLATZ & SEAGER, 1977; LINDE-FORSBERG, 1991; ROTA *et al.*, 1997, ROTA *et al.*, 1998; LINDE FORSBERG *et al.*, 1999; PENA & LINDE-FORSBERG, 2000; RIJSSELAERE *et al.*, 2002, CUNHA e LOPES, 2005). Além disso, outro fator importante é a variação individual observada entre os cães e entre os ejaculados de um mesmo animal, tornando-os mais, ou menos resistentes aos procedimentos de congelação (HOLT, 2000; PENA *et al.*, 2003).

Diversos diluidores são utilizados para a congelação do sêmen canino, dentre eles podemos destacar a lactose (SEAGER, 1969), o Tris (ANDERSEN, 1975), o Triladyl (NOTHLING *et al.*, 1995), o Biociphos W482 e o Laiciphos 478 (SILVA, 1995), o diluidor comercializado pelo Cryogenetics Laboratory of New England - CLONE (STRÖM *et al.*, 1997) e, mais recentemente, um diluidor à base de água de coco (Cardoso *et al.*, 2003). Entretanto, em diversas publicações, o tampão Tris tem-se mostrado superior a outros diluidores, tanto para a refrigeração, quanto para a

congelamento, sendo este o diluidor mais utilizado pela maioria dos grupos de pesquisa da atualidade (FARSTAD, 1996; SILVA *et al.*, 2000).

Um diluente de sêmen deve conter nutrientes, um sistema tampão para ajuste do pH, deve promover uma pressão osmótica e manter uma concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos. O meio diluente deve proteger a célula contra o choque térmico e conter crioprotetores que reduzam os danos às células espermáticas durante a congelamento e posterior descongelamento (CONCANNON & BATTISTA, 1989).

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

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

De um modo geral, utiliza-se para a inseminação artificial um macho de escolha do proprietário da cadela a ser inseminada. Entretanto, com o surgimento dos bancos de sêmen canino, preconiza-se a realização de uma seleção dos animais doadores. Assim, observa-se que esta seleção pode exercer um marcado efeito sobre a fertilidade, visto que existe uma grande variação individual entre os cães (ENGLAND, 1993). Por essa razão, a seleção de reprodutores deve ser feita através de uma detalhada anamnese, verificando-se o desempenho reprodutivo anterior do macho e problemas de saúde atuais ou prévios. Deve também ser procedido um cuidadoso exame clínico geral e andrológico, que deve incluir a inspeção e palpação dos órgãos reprodutivos, observando-se principalmente o tamanho e a consistência testicular, visto que cães com

espermatogênese anormal frequentemente têm testículos de consistência inferior à normal. Em seguida, deve-se proceder à coleta e avaliação do sêmen e inspeção do comportamento de monta (libido), podendo ter continuidade com testes hormonais e análises cromossômicas (CHRISTIANSEN, 1988, FELDMAN E NELSON, 1996).

Diversas metodologias têm sido descritas para a congelação do sêmen canino e variam de acordo com o diluidor e agentes crioprotetores empregados, preconizando o uso de diferentes velocidades de congelação. Em todas elas, busca-se minimizar o dano causado ao espermatozóide pelo processamento, visando recuperar um máximo possível de espermatozoides viáveis (STRÖM *et al.*, 1997). Dentre os diversos métodos existentes, o mais usual é o descrito por Andersen (1975), que serve como base para inúmeros estudos onde têm sido realizadas pequenas modificações nesse método, alcançando excelentes resultados *in vitro* (STRÖM ET AL., 1997) e *in vivo* (ROTA *et al.*, 1999; TSUTSUI *et al.*, 2000). Existem também vários protocolos preconizando diferentes temperaturas e velocidades de descongelação para o sêmen canino. Usualmente, este processo é realizado sob imersão em banho-maria a temperaturas que variam de 37°C (LINDE-FORSBERG, 1991) a 75 oC (OLAR *et al.*, 1989). Ademais, a armazenagem do sêmen canino pode ser realizada em pastilhas (BATTISTA *et al.*, 1988), tubos de alumínio de 5 mL (IVANOVA-KICHEVA *et al.*, 1997) ou, preferencialmente, em palhetas (Cardoso *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003).

2.2 Momento da IA

Na cadela, os ovócitos liberados medem $82,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$ e apresentam-se em um estado imaturo, no início da primeira divisão meiótica, ainda em estado de vesícula germinativa (VG), sendo também denominados de ovócitos primários, não podendo ser fecundados imediatamente após a sua liberação (ENGLAND & CONCANNON, 2002). Ovócitos em estágio de VG estão presentes nas tubas uterinas, 44 horas após a ovulação, ou dois dias após a onda pré-ovulatória de LH. A fase de metáfase I ocorre dentro de 44 a 48 horas da ovulação, sendo caracterizada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar. Na metáfase II, há a formação completa do segundo corpúsculo polar, observada 54 horas após a ovulação (LUVONI *et al.*, 2006). A maturação nuclear nas cadelas esta completa após 48 a 72 horas das ovulações, na presença de elevados níveis de progesterona (CONCANNON *et al.*, 1989; REYNAUD *et al.*, 2005), quando os ovócitos atingem a porção média das tubas uterinas.

O processo da ovulação na maioria das cadelas completa-se com 24 horas, podendo em algumas fêmeas se completar em apenas 12 horas (FONTBONNE & ALANDAIN, 2006). A detecção segura da ovulação é considerada por muitos autores, como um dos fatores mais importantes para determinação do momento ideal da IA nas cadelas. Isto é essencialmente importante quando se utiliza sêmen congelado, devido ao período relativamente curto de longevidade do sêmen descongelado no trato genital feminino, após a IA (LÉVY & FONTBONNE, 2007).

É recomendado o uso de exames clínicos complementares para determinar com segurança, o momento da ovulação. A citologia vaginal não pode ser usada para detectar a ovulação prospectivamente. O exame citológico identifica com segurança o início da fase do diestro citológico; neste caso ocorre um aumento abrupto na porcentagem de células intermediárias e basais. Essa modificação na aparência das células ocorre ao redor do 5º dia após a ovulação; mas esse critério pode ser usado para identificar a ovulação retrospectivamente. A endoscopia vaginal é realizada para determinar o período fértil, mas esse método requer um equipamento caro e também não identifica com segurança o dia da ovulação (ENGLAND & CONCANNON, 2002; SILVA *et al.*, 2003; LÉVY & FONTBONNE, 2007).

A dosagem de progesterona é uma prática rotineira que pode ser realizada com auxílio de *kits* semiquantitativos comerciais (ELISA) ou por laboratórios especializados que fornecem valores quantitativos obtidos por radioimunoensaio (RIA). Dosagens paralelas de progesterona e LH mostraram que o início da elevação significativa da progesteronemia corresponde à onda pré ovulatória de LH, que pode ser uma referência importante para definirem-se as datas da IA, uma vez que a ovulação costuma ocorrer 48 horas após a onda de LH (SILVA *et al.*, 2003).

Tem sido sugerido por England & Concannon (2002) que para estimar o dia de aparecimento da onda pré ovulatória de LH, devem-se utilizar as concentrações séricas de progesterona e de acordo com esses autores quando a progesterona excede 2,0 ng/mL (6,5 nmol/L) corresponde à onda pré ovulatória de LH, ou o dia seguinte. Marseloo *et al.* (2004) demonstraram que os níveis plasmáticos de progesterona no momento da ovulação na maioria das raças é praticamente constante; portanto, as mensurações de progesterona é uma das técnicas mais eficientes para identificar as ovulações nas cadelas.

A maioria dos autores tem obtido melhores resultados utilizando IA intrauterina (mediante laparotomia, laparoscopia ou cateterismo cervical) com o uso de sêmen congelado. As porcentagens de prenhez obtidas com o uso de IA intra-uterina variam de 60 a 90% (WILSON, 1993; NOTHLING & VOLKMAN, 1993; SILVA et al., 1996; TSUTSUI et al., 2000; LINDE-FORSBERG, 2002; KIM et al., 2007). Tsutsui *et al.* (2000), reportaram que o uso de IA intravaginal com sêmen congelado requer no mínimo 20×10^8 espermatozoides móveis para que a fertilidade possa ser comparada com a obtida em acasalamento natural. Já com sêmen descongelado e depositado no útero, a dose inseminante sugerida, foi de aproximadamente $1,5$ a 2×10^8 espermatozoides móveis e a taxa de gestação nesse estudo, variou de 20 a 90%.

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

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi comparar as taxas de fertilidade obtidas com o emprego do sêmen canino congelado frente àquelas obtidas com o sêmen canino fresco, utilizando inseminação intrauterina por laparotomia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados dados armazenados em pastas de controle dos procedimentos reprodutivos da Clínica Veterinária Fervida, especializada em reprodução e localizada na cidade de Porto Alegre. Para este estudo, foram consideradas apenas as IAIU, e o período avaliado compreende aos anos de 2010 e 2011. Neste período foram realizadas 33 IA por laparotomia, 19 com sêmen fresco e 14 com sêmen congelado. Os animais eram provenientes de canis reconhecidos, e todos os procedimentos como, exame clínico, coleta e análise do sêmen, coleta de sangue para dosagem de progesterona plasmática, congelamento do sêmen e IA por laparotomia foram realizados naquela clínica.

Todos os machos doadores de sêmen eram avaliados clinicamente, inclusive com avaliação sorológica para brucelose e leishmaniose, pois animais positivos para essas doenças não são aceitos como reprodutores. No caso de congelamento de sêmen, também era realizado exame de DNA, para que a paternidade possa ser comprovada quando utilizado este sêmen, mesmo após o óbito do animal doador. O sêmen era colhido por estimulação manual do pênis, na presença de uma fêmea no cio. Imediatamente após a colheita, o sêmen era mantido em banho-maria a 37°C e analisado macro e microscopicamente. Eram avaliados parâmetros como cor, volume, motilidade, pH, concentração e morfologia. No caso do sêmen congelado, o protocolo utilizado para congelamento e descongelamento foi aquele determinado pelo Banco Internacional de Sêmen Canino (ICSB).

Nas fêmeas, o momento da ovulação era determinado pelo exame clínico e pela dosagem de progesterona plasmática, que era feita através de radioimunoensaio em um laboratório especializado. O protocolo padrão da clínica determina que a IA seja realizada dois dias após a progesterona ter atingido concentrações entre 4 e 10 ng/mL, que segundo Johnston et al. (2001) é considerado o momento ideal para realizar a IA. Para realização da laparotomia era realizado exame clínico pré-anestésico, além de exames laboratoriais complementares como o hemograma e o perfil bioquímico. Caso os dados coletados indicassem alguma situação fora da normalidade o procedimento era contra indicado, pois apenas fêmeas híginas foram submetidas ao procedimento.

O protocolo anestésico incluía indução com propofol e manutenção anestésica com isoflurano. O monitoramento transanestésico foi feito com o uso de estetoscópio

esofágico para aferição da frequência cardíaca, movimentação do gradil costal ou movimentação do balão reservatório para aferição da frequência respiratória, observação de reflexos e parâmetros para determinação do estágio e plano anestésico, como reflexos oculares (palpebral, corneal e pupilar), rotação do globo ocular, tônus muscular e qualidade de pulso.

O procedimento cirúrgico incluía antissepsia do paciente e utilização de material estéril. As cadelas foram submetidas à técnica de laparotomia e exposição dos cornos uterinos. A amostra de sêmen, previamente descongelada em banho-maria a 37°C, após a análise microscópica do sêmen, que era observado a concentração e morfologia espermática, bem como a avaliação subjetiva da porcentagem de espermatozóides móveis na amostra (motilidade) e a qualidade dessa motilidade, denominada de vigor. Então a dose de sêmen era dividida em duas partes e depositada por meio de seringa, nos dois cornos uterinos. A dose inseminante, utilizada com o sêmen fresco era sempre o ejaculado total. Enquanto a dose utilizada com sêmen congelado variou de 260×10^6 espermatozóides nas cadelas da raça dogue alemão, e 150×10^6 nas cadelas das raças American Staffordshire, Dobermann e golden retriever.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 19 cadelas inseminadas com sêmen fresco, 18 (94,7%) ficaram gestantes, enquanto que das 14 fêmeas inseminadas com sêmen congelado 11 (78,6%) gestaram.

Tabela 1 – IA por laparotomia realizadas com sêmen canino fresco.

DATA	RAÇA	GESTAÇÃO
18/01/2010	B. Inglês	Positiva
22/04/2010	B. Inglês	Positiva
13/07/2010	B. Inglês	Positiva
10/08/2010	B. Inglês	Negativa
19/10/2010	B. Inglês	Positiva
05/01/2011	B. Inglês	Positiva
18/01/2011	B. Inglês	Positiva
09/02/2011	B. Inglês	Positiva
11/02/2011	B. Inglês	Positiva
23/02/2011	B. Inglês	Positiva
08/03/2011	B. Inglês	Positiva
19/07/2011	B. Inglês	Positiva
27/07/2011	Goden retriever	Positiva
14/09/2011	B. Inglês	Positiva
19/09/2011	B. Inglês	Positiva
22/09/2011	B. Inglês	Positiva
10/10/2011	B. Inglês	Positiva
14/12/2011	B. Inglês	Positiva
05/0/12010	B. Inglês	Positiva

Figura 1- Taxa de gestação utilizando sêmen canino fresco.

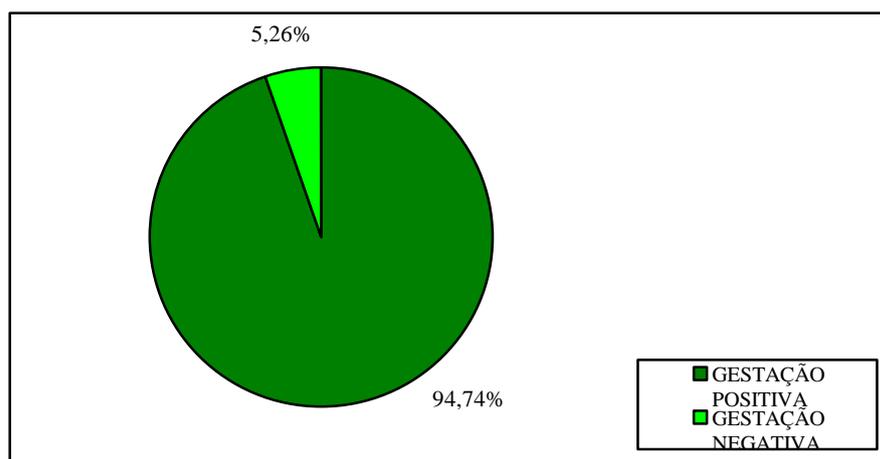
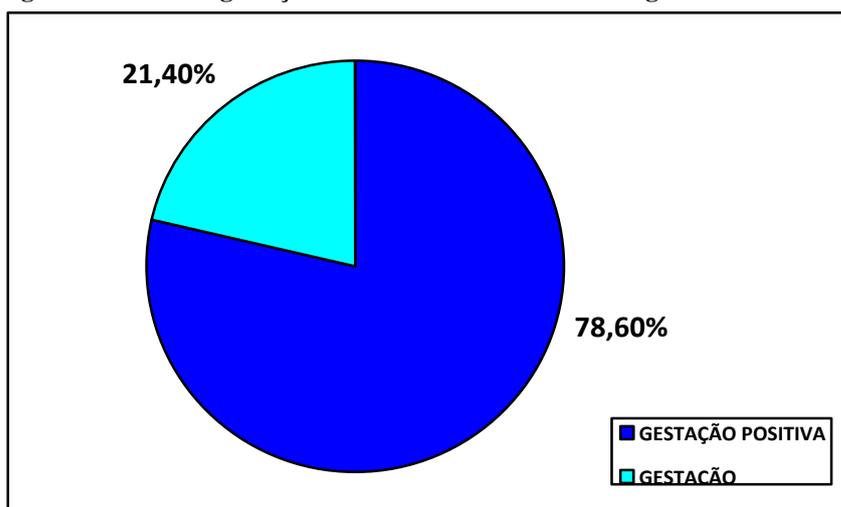


Tabela 2 – IA por laparotomia, realizadas com sêmen canino congelado.

DATA	RAÇA	GESTAÇÃO
21/01/2010	Dobermann	Negativa
17/01/2010	American staffordshire	Positiva
14/02/2010	Dogue alemão	Negativa
02/04/2010	Dogue alemão	Positiva
03/05/2010	Dogue alemão	Positiva
04/10/2010	Dogue alemão	Positiva
08/10/2010	Dogue alemão	Negativa
22/11/2010	Dobermann	Positiva
10/10/2010	Golden retriever	Positiva
15/10/2010	Golden retriever	Positiva
08/02/2011	Dogue alemão	Positiva
24/03/2011	Dogue alemão	Positiva
03/05/2011	Dogue alemão	Positiva
26/08/2011	Dogue alemão	Positiva

Figura 2 – Taxa de gestação utilizando sêmen canino congelado.



O presente estudo demonstrou que a IAIU por laparotomia utilizando sêmen congelado, apresenta uma taxa de fertilidade inferior àquela que utilizou sêmen fresco. Como sugerido por Linde-Forsberg e Forsberg (1989). Porém, essa taxa de gestação, ainda assim, aproxima-se à taxa de gestação obtida através da monta natural, a qual, segundo Daurio *et al.* (1987), apresenta eficiência em torno de 85% nesta espécie. O estudo também evidenciou, que a taxa de gestação da IAIU que utiliza sêmen fresco é bastante elevada, assim como Silva (1995) descreve 100% de gestação para a IAIU por laparotomia.

O número mínimo de espermatozóides requerido para a IA não está bem estabelecido. Taxas de fertilidade satisfatórias, ou seja, que se aproximam das obtidas através da monta natural, já foi alcançado com doses inseminantes de 35×10^6 espermatozóides móveis (Wilson, 1993). Segundo Guérin (1998), a fertilidade entre as raças é bastante variável, sendo ainda constatado que o número de espermatozóides por ejaculado varia proporcionalmente de acordo com o tamanho do cão. Assim, talvez seja necessário aumentar a dose inseminante para as raças de grande porte, uma vez que esse maior número de espermatozóides poderia estar correlacionado a um maior comprimento do aparelho genital da cadela.

Apesar da difundida utilização da IA na espécie canina na atualidade, são necessários ainda um maior conhecimento e controle dos fatores que podem influenciar seu sucesso. Assim, diversos estudos continuam sendo desenvolvidos visando encontrar metodologias de preservação de gametas que permitam uma perda mínima da qualidade seminal, uma maior eficácia na determinação do momento ideal para a inseminação e utilização de uma via eficiente que não traga riscos ao animal.

Entende-se, desse modo, que o estudo envolvendo a IA em cães é uma forma de otimização do material genético de canídeos domésticos e selvagens, uma vez que as biotecnologias estabelecidas para a espécie canina poderiam servir como base para estudos visando a preservação e difusão do material genético oriundo de canídeos selvagens ameaçados ou em extinção, haja vista a similaridade filogenética entre tais espécies (Wayne e Vila, 2001).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No período analisado, os resultados obtidos com a IA por laparotomia, tanto com sêmen canino congelado, quanto com sêmen canino fresco mostraram-se satisfatórios. Dessa forma, este estudo demonstra que o local do estágio executa técnicas de reprodução canina de forma eficiente e precisa, correlacionando orientações científicas com as evidências práticas.

REFERÊNCIAS

ALTHOUSE, G.C., KO, J.C.H., HOPKINS, S.M., EVANS, L.E. (1991). Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, 199, 227-229.

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

BATTISTA, M., PARKS, J., CONCANNON, P. (1988). Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using pipes, lactose, tris or test extenders. **Proceedings 11^o International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination**, 3, 229.

BOUCHER, J., FOOTE, R.H., KIRK, R.W. (1958). 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**, 48, 67-86.

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

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

CONCANNON, P.W., MCCANN, J.P., TEMPLE, M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, 39, 3-25.

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

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

CHIRINÉA, V.H. *et al.* Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de congelamento de sêmen de cães. **Rev. Bras. Reprod. Animal.** v.27, n.3, p.361-363, 2003.

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

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

ENGLAND, G.; CONCANNON, P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. Ithaca: **International Veterinary Information Service**, 2002. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 09 de julho de 2012.

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

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

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

FARSTAD, W. (2000). Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, 53, 175-186.

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

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

FONTBONNE, A., BADINAND, F. (1993b). Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, 47, 531-532.

FONTBONNE, A., MALANDAIN, E. Ovarian ultrasonography and follow-up of estrus in the bitch and queen. **Waltham Focus**, v.16, n.2, 2006. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 06 de julho de 2012.

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

GILL, H.P. *et al.* (1970). Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. **American Journal of Veterinary Research**, 31, 1807-1813.

- GUÉRIN, C. (1998). A inseminação artificial na espécie canina. **A Hora Veterinária**, 105, 25-32.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.**, v.11, p.73-88, 1990.
- HARROP, A.E. (1955). Some observations on canine semen. **Veterinary Record**, 67, 494-498.
- HAY, M. A.*et al.* Effects of cooling, freezing, and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **J. Reprod.Fert. Suppl.**, v.51, p.99-108, 1997.
- HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C.W. (1998). An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. **Animal Reproduction Science**, 51, 321-332.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.3-22,2000.
- IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. Validation of sperm quality analyser (SQA) for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.1143-1158, 2001.
- IVANOVA-KICHEVA, M.G., BOBADOV, N.D., SOMLEV, B. (1997). Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, 48, 1343-1349.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OSLON, P.N.S. Vaginal Cytology. In: **Caninefeline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. cap.3, p.32-40.
- KIM, H.J.; OH, H.J.; JANG, G.; KIM, M.K. Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-thawed canine semen. **J. Vet. Sci.**, v.8, n.1, p.75-80, 2007.
- LARSSON, B., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (2000). Can we use in vitro fertilization to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, 60-61, 327-336.
- LÉVY, X.; FONTBONNE, A. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, n.1, p.128-134, 2007.
- LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M. (1989). Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, 39, 299-310.
- LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. **Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Prac.**, 21, 467-486, 1991.
- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. **J.Reprod. Fert. Suppl.**, v.43, p.313-323, 1993.

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

LINDE-FORSBERG, C. Intra-uterine insemination in the dog using scandinavian transcervical catheter and a comparison with other methods. **Ithaca: International Veterinary Information Service**, 2001. Disponível em: <www.ivis.org.>. Acesso em: 12 de julho de 2012.

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

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

MAYENCO-AGUIRRE, A.M., PÉREZ-CORTÉS, A.B. (1998). Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. **Theriogenology**, 50 (2), 195-204.

METCALF, S. (1999). Assisted reproduction in the bitch. Thesis (Master of Sciences). Institute of Reproduction and Development – Faculty of Science, Monash University, Australia

MARSELOO, N. *et al.* Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. In: 5. International symposium on canine and feline reproduction, 2004, Embu das Artes. **Abstracts Book**. São Paulo, 2004. p.75-77.

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

NOTHLING, J.O., GERSTENBERG, C., VOLKMANN, D.H. (1995). Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – a retrospective study. **Journal of South Africa Veterinary Association**, 66, 49-55.

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

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

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

PENA, A.I. *et al.* Studies on the intracellular Ca²⁺ concentration of frozen-thawed dog

spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. **Reprod. Domest. Anim.**, v.38, p.27-35, 2003.

PLATZ, C.C., SEAGER, S.W.J. (1977). Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Laboratory Animal Science**, 27, 1013 – 1016.

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

RIGAU, T.*et al.*; Different effects of glucose and fructose on energy metabolism in dog sperm from fresh ejaculates. In: International congress of animal reproduction, 14., 2000, Stockholm: European Society for Study of Reproduction, 2000. p. 24.

RIJSSELAERE, T.*et al.*; A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1669-1681,2002.

RODRIGUES-MARTINEZ, H., EKWALL, H., LINDE-FORSBERG, C. (1993). Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, 47, 279-285.

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

ROTA, A. *et al.* Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. **Theriogenology**, v.51, n.6, p.1045-1058, 1999.

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

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

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

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. (2000). Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. **Ciência Rural**, 6, 1021-1025.

SILVA, A.R. *et al.* (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, 59, 821-829.

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

SILVA, L.D.M., ONCLIN, K., VERSTEGEN, J.P. (1996). Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, 37, 4, 313-320.

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

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

TSUTSUI, T. *et al.* E. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of Orvus ES Paste-Supplemented egg yolk Tris-fructose citrate. **J. Vet. Med.Sci.**, v.62, p.603-606, 2000.

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