

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Trabalho de Conclusão de Curso:

**Refrigeração do sêmen canino com diferentes diluentes e temperaturas
de armazenamento**

Tatiana Almeida Pignataro
Orientador: Rodrigo Arruda de Oliveira

BRASÍLIA - DF

JULHO/2015



TATIANA ALMEIDA PIGNATARO

**Trabalho de Conclusão de Curso:
Refrigeração do sêmen canino com diferentes diluentes e temperaturas
de armazenamento**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientador: Rodrigo Arruda de Oliveira

BRASÍLIA - DF
JULHO/2015

Pignataro, Tatiana Almeida

Refrigeração do sêmen canino com diferentes diluentes e temperaturas de armazenamento. / Tatiana Almeida Pignataro; orientação de Rodrigo Arruda de Oliveira. – Brasília, 2015.

24p. : il.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Tatiana Almeida Pignataro

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Refrigeração do sêmen canino com diferentes diluentes e temperaturas de armazenamento

Ano: 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Tatiana Almeida Pignataro

Agradecimentos

Agradeço a universidade de Brasília pelo curso oferecido e a todos os professores do curso de Medicina Veterinária pelos ensinamentos e pelo apoio ao longo desses cinco anos de curso, em especial aos professores Rodrigo Arruda, Ivo Pivato e Caic Saquetti. Agradeço ao Heitor Teixeira que disponibilizou seu tempo para a estatística deste estudo. Agradeço aos proprietários Edhemar Marcondes Pignataro e Carlos Alberto Villa Chan que permitiram o uso de seus animais e forneceram o espaço de suas casas para as primeiras análises de amostras do experimento. Agradeço ao meu pai Edhemar Marcondes Pignataro, a minha madrastra Sheila Lima Dias Pignataro, a minha avó Milce Magaldi Martins Almeida e ao meu namorado André Porto Netto pelo carinho, apoio e compreensão ao longo desse período. Agradeço ao meu irmão Thyago Almeida Pignataro e minha cunhada Fernanda da Silva Dias por serem exemplo de força para mim. Agradeço a minha irmã Taiane Almeida Pignataro por ficar sempre ao meu lado nas horas difíceis.

SUMARIO

PARTE I – Artigo científico	
1. RESUMO E ABSTRACT.....	01
2. INTRODUÇÃO	02
3. MATERIAIS E MÉTODOS	03
3.1. Animais.....	03
3.2. Exame andrológico	04
3.3. Colheita de sêmen	04
3.4. Análise imediata.....	04
3.5. Análise mediata	05
3.6. Método de diluição e separação das amostras	05
3.7. Morfologia.....	06
3.8. Análise estatística.....	06
4. RESULTADO	06
5. DISCUSSÃO.....	09
6. CONCLUSÃO	12
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
PARTE II – Relatorio de estagio	
8. INTRODUÇÃO	16
9. QUADRO DE ATIVIDADES.....	17
10. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES.....	17
11. CONCLUSÃO.....	18

PARTE I – Artigo

Refrigeração do sêmen canino com dois diferentes diluentes e duas temperaturas de armazenamento

Cooling of canine sperm using two different extenders at two storage temperatures

RESUMO

A inseminação artificial é uma importante ferramenta de manutenção das espécies e melhoria dos seus exemplares quanto a genética. O estudo de metodologias para a refrigeração de sêmen canino visa obter a melhor forma para garantir a qualidade do sêmen durante o transporte. Objetivou-se avaliar a qualidade do sêmen canino refrigerado com dois diluentes (Kenney – diluente I e gema de ovo – diluente II) sob duas temperaturas (5°C e 15°C) durante 36 horas de armazenamento. O sêmen de 6 reprodutores da raça Pastor Alemão foi colhido via manipulação digital e imediatamente dividido em duas partes sendo cada porção diluída com um dos dois diluentes e refrigerado em caixas específicas para transporte de sêmen equino com temperaturas internas de 5°C ou 15°C. A motilidade total, vigor e a integridade de membrana plasmática foram avaliadas às 12, 24 e 36h pós refrigeração. Houve superioridade da motilidade total, vigor e integridade de membrana quando se utilizou o diluente I tanto para refrigeração a 5°C quanto para 15°C em todos os momentos avaliados. Concluiu-se que o diluente I garante uma melhor manutenção para refrigeração e transporte do sêmen canino..

Palavras chave: análises espermáticas, armazenamento de sêmen, cães, qualidade seminal, transporte de semen canino.

ABSTRACT

The artificial insemination is an important way to keep and improve the genetic of the species. The knowledge of cooling canine sperm methods aim best way to ensure the quality in the transport of semen. The aim of this study was evaluate the quality of canine semen after cooling with two different extenders (Kenney – extender I and Egg Yolk – extender II) at two different storage temperatures (5°C and 15°C) during 36 hours. Semen from six male dogs from German shepherd breed was collected by digital manipulation and immediately divided in two equal parts. Each part was diluted in both extenders and cooled two different storage temperature (5°C and 15°C). The total motility, strength, plasmatic and acrosomal integrity were evaluated at 12, 24 and 36 hours of storage until 36h. The total motility, strength and plasma membrane integrity were higher when the the extender I was used at both temperatures, as well in all evaluated times of storage. In conclusion the extender I was better to keep the quality of cooled canine semen.

Key words: sperm analysis, sperm storage, dogs, semen quality, semen transport canine

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma técnica antiga e importante na Medicina Veterinária. Desenvolvida para o melhoramento genético das espécies, possui outras vantagens na sua prática, como o controle de doenças venéreas, maior cobertura de fêmeas sem desgaste excessivo do macho, produção de descendentes de machos geneticamente superiores em diferentes lugares sem necessidade de transporte dos animais para acasalamento e utilização de reprodutores já mortos (CUNHA, 2008). A mais antiga documentação sobre o uso da IA é do fisiologista italiano Spallazani, que conseguiu o nascimento de filhotes de cães a partir da inseminação artificial em 1780, porém apenas a partir de 1900 na Rússia que foram iniciados estudos extensos com animais domésticos (YOSHIDA, 2000).

O desenvolvimento de protocolos de preservação espermática que viabilizem o transporte de sêmen dentro e entre países desperta o interesse de Médicos Veterinários e criadores de cães, visto que este procedimento permite o intercâmbio de material genético entre regiões distantes (NASCIMENTO, 2007). HARROP (1956) foi o primeiro a descrever a obtenção de crias viáveis oriundas de IA após o transporte intercontinental do sêmen canino diluído e refrigerado em leite. Desde então, o transporte de sêmen vem sendo realizado constantemente entre e dentro dos países (MOTA-FILHO, 2007). Porém, imprevistos de viagens, tais como atraso na saída ou pneu furado, muitas vezes fazem com que a viabilidade espermática seja comprometida pelo atraso no transporte (NAGAO et al., 2007). Por esse motivo, é contínua a tentativa dos pesquisadores de incrementar metodologias para refrigeração e criopreservação do sêmen, que garanta boa qualidade espermática por períodos longos.

Muitos fatores são envolvidos no processo de refrigeração e congelamento do sêmen de cães e, ainda hoje, nenhuma metodologia parece ser a ideal para todos os cães e para todos os ejaculados, pois variações intrínsecas às propriedades, como sensibilidade osmótica entre espermatozoide de diferentes cães e ejaculados faz com que a resposta à refrigeração não seja previsível (EILTS, 2005).

Diluentes são utilizados com a finalidade de proteger os espermatozoides, conservar sua motilidade e fertilidade por um período de tempo mais longo, providenciar substrato energético e prevenir efeitos deletérios de mudanças no pH e osmolaridade durante os processos de conservação térmica (CHIRINÉA, 2006).

A utilização de diluente à base de ovo e leite desnatado é amplamente utilizada para a refrigeração do sêmen canino. Durante o choque térmico da refrigeração ou criopreservação, as lipoproteínas interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides e propiciam a proteção da célula. (Bouchard et al., 1990). Segundo Foulkes (1977), a gema de ovo previne também a liberação da enzima hialuronidase pela célula espermática. Porém a utilização do ovo, pelo fato de serem diferentes de acordo com a alimentação de cada galinha, não garante a padronização na confecção deste diluente. Por isso a importância avaliação de diluentes comerciais, que possuem seus componentes padronizados.

A inseminação artificial tem se tornado uma prática cada vez mais comum na rotina de criadores de cães, entretanto ainda não se padronizou um diluente para utilização com o sêmen de cães. Portanto, objetivou-se comparar dois diluentes de refrigeração (kenney e gema de ovo), e duas temperaturas de refrigeração de sêmen descritos para outras espécies, como bovinos e equinos, a 5°C e 15°C por até 36h de refrigeração.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização deste experimento, os animais selecionados passaram por exame físico completo e exame andrológico. Foram eliminados os cães que não seguiam os padrões exigidos em um ou mais requisitos.

De 12 cães avaliados, foram utilizados seis cães da raça Pastor Alemão (n=6). Todos os cães são de raça pura com Pedigree, criados em canis, porém exercitados todos os dias, com peso médio de $38 \pm 3,6$ kg, com idade de 2 a 6 anos, alimentados com ração Royal Canin® tipo Max Adult própria para a raça.

3.2. Exame andrológico

O exame andrológico foi realizado através de exame clínico geral dos reprodutores, palpação e inspeção visual para avaliar a integridade de todo o aparelho reprodutor, além de medições de altura, comprimento e largura de ambos os testículos, também foi realizada colheita e análise de sêmen fresco de acordo com CBRA (2013).

Foram eliminados cães criptorquidas cirúrgicos, que apresentaram baixa motilidade do sêmen fresco e/ou concentração.

3.3. Colheita de sêmen

A colheita de sêmen se deu por meio da manipulação digital do pênis até a formação do nó peniano e início da ejaculação, colhido em tubo graduado de 50mL. Foram descartados os primeiros jatos do ejaculado, utilizando-se somente a segunda e terceira fração do ejaculado.

Foram realizadas três colheitas de cada cão da com uma semana de intervalo entre as colheitas.

3.4. Análise imediata

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi avaliado macroscopicamente quanto ao volume por meio de tubo graduado e ao aspecto (cor e densidade) por observação visual subjetiva. Também foi avaliado o pH através de fita medidora de pH. Além de motilidade total e vigor com auxílio de um microscópio óptico em aumento de 200x, por observação subjetiva(CBRA, 2013).

3.5. Análise mediata

O sêmen fresco foi diluído na proporção de 1:20 (sêmen:formol salina a 10%) para a realização da concentração espermática em câmara de Neubauer.

A integridade de membrana plasmática foi realizada por meio de coloração supravital (eosina-nigrosina), sendo avaliadas no mínimo 200 células fazendo a proporção de células íntegras e células não íntegras, onde as cabeças coradas em roxo foram consideradas não íntegras e as brancas não coradas foram consideradas íntegras. (CBRA, 2013)

3.6. Método de diluição e separação das amostras

O ejaculado obtido foi dividido em duas alíquotas de igual volume para que se fosse separado os grupos: Diluente I (Kenney¹ - leite em pó desnatado, glicose, bicarbonato e amicacina) (Kenney et al., 1975) e Diluente II (60mL de diluente sendo 12mL de gema de ovo, 48mL de leite desnatado UHT, acrescido de 6µg de estreptomicina e 386µg de penicilina) (ROMAGNOLI, 2002) .

A proporção de diluente e sêmen fresco foi de 2:1. Após a diluição, o material foi alíquotado em tubos de microcentrífuga e distribuídos igualmente em seis caixas comerciais de transporte de sêmen equino², três caixas à 5°C e três à 15°C, por 36h. As avaliações de motilidade total, vigor e integridade de membrana plasmática foram realizadas nos momentos 0h, 12h, 24h e 36h. Onde 0h corresponde à avaliação do sêmen fresco e as demais após a refrigeração.

A utilização de seis caixas se deu a fim de evitar a manipulação em excesso das amostras e alteração de temperatura durante a abertura da caixa, portanto uma caixa para cada momento avaliado. Antes das análises os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por cinco minutos.

¹ Botusêmen – Botupharma – Botucatu, São Paulo/Brasil.

² Botubox – Botupharma, Botucatu/SP/Brasil

3.7. Morfologia

A análise morfológica foi realizada com a avaliação de no mínimo 200 células fazendo a proporção de defeitos maiores, defeitos menores e células normais (sem defeitos) utilizando câmara úmida de contraste de fase.

As análises em câmara úmida de contraste de fase foram feitas com a diluição do sêmen em formol salina 10% na proporção de 1:20 respectivamente. A visualização ocorreu em microscópio de contraste de fase com lente de aumento de 100 sob óleo de imersão.

Consideraram-se defeitos maiores: cauda enrolada, gota proximal, cabeça anormal, cabeça gigante, cabeça dupla, cabeça solta e defeitos de parte intermediária. Foram considerados defeitos menores: cauda dobrada, gota distal e cabeça pequena.

3.8. Análise estatística

As análises dos resultados concernentes às avaliações seminais de motilidade, vigor e integridade de membrana, foram realizadas através médias \pm Desvio Padrão fazendo-se uma ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa R.

4. RESULTADO

As mensurações médias dos testículos estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1- Mensuração testicular com a média de altura, largura e comprimento de seis cães da raça Pastor Alemão.

	Comprimento		Largura		Altura	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
	3,2 \pm 1,5	3,0 \pm 1,3	2,7 \pm 1,5	3 \pm 1,3	4,0 \pm 1,9	4,5 \pm 2,5
Total	3,1 \pm 0,1		2,8 \pm 0,2		4,2 \pm 0,4	

O aspecto do sêmen fresco variou entre leitoso e aquoso e a coloração branca opalescente. O volume médio foi de $11,5 \pm 5,9$ mL, a concentração média foi de $175,6 \pm 103,1$ espermatozoides/mL e o pH seminal $6,6 \pm 0,2$. As análises de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática ainda no sêmen fresco, apresentaram valores de $86,4 \pm 9,8$ %, $4,0 \pm 0,5$ e $70,4 \pm 27,9$ % respectivamente. Os valores obtidos para a morfologia espermática foram de $69,1 \pm 21,5$ % de espermatozoides normais, $10 \pm 9,1$ % de defeitos maiores e de $20,9 \pm 16,9$ % de defeitos menores.

Com relação ao método de refrigeração, observa-se na Tabela 2 e no Gráficos 1 que houve efeito de qualidade maior do sêmen para a utilização do diluente I do que no diluente II na avaliação por bloco - onde os três parâmetros (motilidade+vigor+integridade de membrana plasmática) são avaliados em conjunto - em todas as horas e nas duas temperaturas. Porém não ocorreu interação do diluente com a temperatura, em nenhum dos casos ($P < 0,05$).

Ao avaliar os parâmetros separados, somente a motilidade total e o vigor em todos os momentos avaliados, tiveram os resultados superiores no diluente I. Enquanto que a integridade de membrana plasmática não diferiu entre os diluentes, porém foi superior para a temperatura de armazenamento de 15°C nos dois diluentes.

Não foi possível observar efeito de interação entre temperatura:Hora:Diluente. Entretanto, para todas as variáveis foi possível observar qualidade superior no segundo momento de avaliação (12h de refrigeração) para o terceiro momento (24h), e do terceiro para a o quarto (36h de refrigeração).

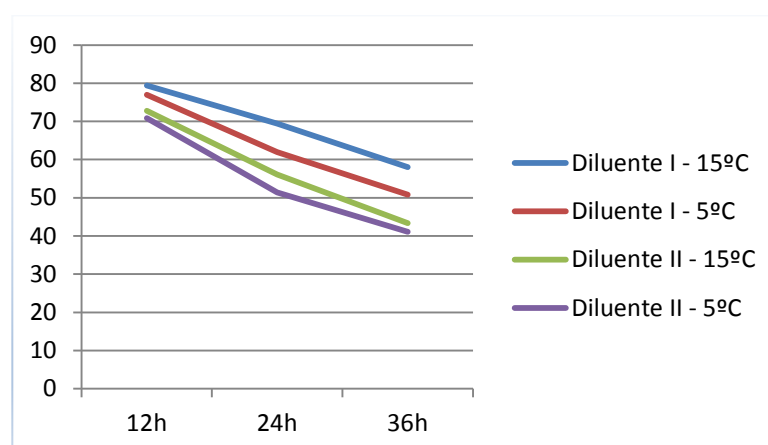
TABELA 2 – Avaliação a cada 12 horas de refrigeração, quanto à porcentagem de motilidade total (MOT%), vigor e porcentagem de integridade de membrana plasmática (IM%) dos espermatozoides, nas diferentes temperaturas e diluentes.

Tempo		Tratamento			
		Diluyente I	Diluyente I	Diluyente II	Diluyente II
		15°C	5°C	15°C	5°C
12h	Mot%	79,4±17,8 ^{aA}	76,9±17,9 ^{aA}	72,8±20,3 ^{bA}	70,8±15,8 ^{bA}
	Vigor	3,8±0,5 ^{aA}	3,8±0,5 ^{aA}	3,6±0,6 ^{bA}	3,6±0,7 ^{bA}
	IM%	78,7±15,9 ^{aA}	78,3±14,8 ^{aA}	76,7±13,3 ^{bA}	71,2±9,0 ^{bA}
24h	Mot%	69,4±17,2 ^{ab}	61,9±22,4 ^{ab}	56,1±25,0 ^{bb}	51,4±23,6 ^{bb}
	Vigor	3,7±0,7 ^{ab}	3,5±0,7 ^{ab}	3,3±0,8 ^{bb}	3,2±0,8 ^{bb}
	IM%	76,0±13,3 ^{ab}	68,3±18,9 ^{abb}	70,1±20,5 ^{abb}	64,5±15,6 ^{bb}
36h	Mot%	58,1±18,8 ^{ac}	50,8±22,0 ^{ac}	43,3±23,5 ^{bc}	41,1±24,7 ^{bc}
	Vigor	3,2±0,5 ^{ac}	2,9±0,9 ^{ac}	2,7±0,5 ^{bc}	2,7±0,7 ^{bc}
	IM%	70,6±14,6 ^{ac}	62,5±20,2 ^{bc}	63,2±19,4 ^{bc}	61,4±21,6 ^{bc}

a,b,c – Letras sobrescritas minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P<0,05$) para o teste de Tukey.

A,B,C – Letras sobrescritas maiúsculas diferentes para a mesma variável na mesma coluna indicam diferença estatística ($P<0,05$) para o teste de Tukey.

GRAFICO 1 – Avaliação de 12h, 24h e 36h de refrigeração quanto à motilidade total espermática (eixo y) nos dois diluentes e nas duas temperaturas.



5. DISCUSSÃO

Segundo a Confederação Brasileira de Cinofilia (Padrão FCI nº166 – 23/12/2010), não existe um padrão para a mensuração testicular, o animal apenas deve possuir ambos os testículos. Todos os animais utilizados neste experimento estão dentro dos padrões e seguem todos os requisitos de reprodutores da raça exigidos pelo *Weltunion der Vereiner für Deutsche Schäferhunde* (WUSV).

A atividade metabólica do espermatozoide resulta na formação de íons de hidrogênio, que poderiam acidificar o meio. Sabe-se que o pH seminal de cães varia de 6,4 a 6,8. Com isso, faz-se necessário um mecanismo para a remoção desses íons, visto que a diminuição de pH poderia reduzir a longevidade e a capacidade fecundante da célula espermática (SILVA, 2004), observa-se então a importância do diluente na preservação do sêmen canino.

De acordo com o CBRA (2013), o pH seminal varia de 6,3 a 7,0 e o pH do fluido prostático de 6,0 a 7,4. Portanto, o pH seminal dos cães deste estudo estão dentro do intervalo normal ($6,63 \pm 0,22$). Em todas as espécies domésticas, a alteração do pH para mais ou para menos pode ser indicativo de contaminação do sêmen com urina ou infecção de alguma porção do trato reprodutor (HAFEZ & HAFEZ. 2004).

O volume do ejaculado canino é muito variável e não existe um intervalo considerado normal para esse parâmetro. Neste experimento, o volume variou de 3mL à 25mL.

A cor da fração espermática do ejaculado dos cães pode variar de branco opalescente ao turvo e levemente amarelado. Esta variação é decorrente de alterações na concentração espermática e o aspecto vai do leitoso ao aquoso, dependendo da quantidade de fração prostática coletada que é límpido e transparente. (NELSON&COUTO et. al.; CUNHA, 2008)

A coloração do ejaculado que varia do amarelo-palha para o amarelo mais escuro é indicativa de contaminação por urina, já as cores esverdeadas com ou sem a presença de grumos é sugestivo da presença de pus. O sêmen com coloração avermelhada ou amarronzada geralmente apresenta sangue. A avaliação citológica completa do ejaculado é de extrema importância, principalmente nos casos de relato de infertilidade do macho.

(NELSON&COUTO et al). Os ejaculados utilizados neste experimento tiveram coloração branca opalescente.

Para refrigeração de sêmen, idealiza-se que a motilidade do sêmen fresco seja igual ou superior a 60%, o vigor igual ou superior a 3 e defeitos totais de morfologia inferiores a 30% (CBRA, 2013). Os dados de sêmen fresco obtidos neste trabalho foram de $86,38 \pm 2,92$ % (motilidade total), $4,05 \pm 0,09$ (vigor) e $69,1 \pm 21,5$ % de espermatozoides normais, $10 \pm 9,1$ % de defeitos maiores e de $20,9 \pm 16,9$ % de defeitos menores (morfologia). Esses valores caracterizam que as amostras colhidas estavam dentro dos intervalos exigidos para a espécie (JOHNSTON, 2001).

Os resultados colhidos neste trabalho após a refrigeração revelam que o diluente I teve maior capacidade de manter a viabilidade do sêmen canino por mais tempo do que o diluente II em todos os momentos avaliados. Portanto, o diluente I se mostrou mais eficiente, sendo a 15°C melhor que a 5°C.

A motilidade indicou que os componentes do diluente I têm uma maior capacidade de proteção das células espermáticas frente ao choque térmico do processo de refrigeração (ROTA, 1998), pois houve uma queda na motilidade, ao longo da refrigeração em ambas as temperaturas. Entretanto o sêmen com diluente II teve um decréscimo maior na motilidade, mas se manteve acima de 40% até 36h de refrigeração.

Quanto à integridade de membrana plasmática, os percentuais foram superiores a 60% até 36h, o que indica a viabilidade seminal em todos os momentos. A manutenção da integridade de membrana plasmática é importante visto que a mesma apresenta uma correlação com a fertilidade de uma amostra seminal avaliada (STROM, 1999).

No estudo realizado por BENCHARIF (2013a), foram avaliados quatro diluentes diferentes para a refrigeração de sêmen canino a 4°C por 7 dias, incluindo o artesanal de gema de ovo (mesmo utilizado para este experimento) e outros diluentes comerciais. O percentual de espermatozoides móveis na avaliação de 24h foi de 72% no diluente contendo gema de ovo, nos demais diluentes, o resultado foi de 55,3%, 74,3% e 56,1%, para Equex, 6% LDL e INRA96 respectivamente em 24h de refrigeração. Comparados com os resultados encontrados no presente estudo, no diluente I os espermatozoides tiveram motilidade total de $61,9\% \pm 22,4$ às 24h e com o diluente II a base de

gema de ovo a motilidade total foi de $51,4\% \pm 23,6$ também na análise de 24h a 5°C , portanto pode-se considerar que os resultados deste trabalho são inferiores ao trabalho de BENCHARIF (2013) e invertidos quando a análise é feita comparando o diluente a base de gema de ovo com um diluente comercial, visto que neste estudo o diluente comercial se mostrou mais eficiente, enquanto que no de BENCHARIF(2013), a gema de ovo e o 6% LDL foram mais efetivos. Os valores inferiores podem ser explicados pela diferença no preparo do diluente a base de gema de ovo, visto que este diluente não é padronizado pela procedência dos materiais serem diferentes, outra e talvez principal diferença seja a de raças dos cães utilizados em cada experimento.

Em outro trabalho também realizado por Bencharif (2013b) é feita a comparação do diluente contendo gema de ovo com um diluente à base de 6% LDL e outro de 6% LDL+20mmol de glutamina, sendo encontrada motilidade, respectivamente, de $72,13 \pm 3,63$, $73,98 \pm 3,02$ e $73,61 \pm 3,15$ para 24 horas de refrigeração e $61,75 \pm 4,1$, $63,69 \pm 3,82$ e $64,86 \pm 4,3$ para 48 horas, valores superiores aos encontrados neste trabalho. O que poderia significar que os diluentes de 6% LDL tem uma capacidade melhor de manter a motilidade do sêmen, mas serão necessários mais estudos de comparação com os diluentes utilizados nesse trabalho.

Antes de escolher a melhor maneira para refrigeração e transporte do sêmen canino, fatores além da qualidade do diluente devem ser levados em conta. A qualidade do sêmen fresco, o custo benefício e praticidade no preparo da amostra a ser enviada são exemplos de quesitos importantes a serem avaliados.

Dentre os diluentes comerciais disponíveis (ex.: INRA96 - R\$90,00/200mL), o Botusemen se apresenta como o economicamente mais viável quando observado a relação qualidade:preço por custar R\$12 o frasco com 100mL. Entretanto, a produção do Diluente II comparada ao Diluente I, é opção mais barata dado o valor individual de seus componentes (caixa de ovo R\$3,50/dúzia, leite desnatado UHT R\$2,99 1L e antibióticos) e o uso de pequena quantidade deles.

A praticidade de se utilizar um diluente comercial, que já vem com todos os ingredientes necessários e na quantidade correta, é muito maior comparado à

utilização de balança de precisão para medição correta dos antibióticos e manipulação dos demais componentes para a confecção do diluente UHT/EY.

6. CONCLUSÃO

O diluente comercial a base de leite desnatado e açúcares, utilizado para refrigeração de sêmen de equino, apresentou capacidade superior de manutenção da qualidade do sêmen canino resfriado nas duas temperaturas comercialmente utilizadas (15°C e 5°C), em todos os momentos avaliados, quando comparado ao diluente a base de gema de ovo, leite desnatado e antibióticos. A temperatura de 15°C mostrou eficiência superior em ambos diluentes do que a refrigeração a 5°C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENCHARIF, D. 2013a. Refrigeration of canine sperm at + 4°C: Comparative study of four different extenders for the refrigeration of canine sperm at +4°C: LDL, Tris egg yolk, Equex®, and INRA96®. **Revue de Médecine Vétérinaire**. 164, 5, 252-262, 2013.

BENCHARIF, D. 2013b. Canine-chilled Sperm: Study of a Semen Extender Made with Low-density Lipoproteins from Hen Egg Yolk Supplemented with Glutamine. **Reproduction in Domestic Animals** 48, 258–266, 2013.

BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R.S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility, **Theriogenology**, v.34, p.147-157, 1990.

CARDOSO CARDOSO, J. F. S. et al. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. **Revista Brasileira de Reproducao Animal**, v.29, n.3/4, p.179-187, jul./dez, 2005.

CARDOSO, J. F. S. et al. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP-106 e resfriado a 4°C. **Comunicata Scientiae** 1(2): p.146-152, 2010.

CHIRINÉA, V.H. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 407-415, out/dez, 2006.

CUNHA, I. C. N. Exame andrológico do cão. **Jornal brasileiro de ciência animal** v. 1, n. 1, p. 49-65, 2008.

DOTT HM, Foster GC. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live/dead' stain. **Journal of Reproduction & Fertility**, 29, 443-445, 1972.

EILTS, B. E. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 64, p. 685-691, 2005.

FRENEAU, G.E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução animal** v.35, n.2, p.160-170, abr./jun. 2011. Belo Horizonte-MG.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction & Fertility**. v.49, p.277-284, 1977.

HAFEZ, E.S.E e Hafez, B. 2004. **Reprodução Animal**. 7ª edição brasileira. Manole, São Paulo

HARROP, A.E. 1956. Artificial insemination in dogs – the first transatlantic conception. **Brit. Vet. J.** 112: 338-340.

IGUER-OUADA, M. & Verstegen, J.P. 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. **Theriogenology**, 55:671-684.

JOHNSTON, S. D., Kustritz, M. V. R. & Olson, P. N. S. 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: **W.B.Saunders**, 592p.

JONATHAN FLORES A. Refrigeración de semen canino utilizando glucosa, fructosa, trehalosa o sacarosa para prolongar la supervivencia espermática. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú** 21 (1): p. 26-34, 2010

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: **Annual Convention American Association Equine Practitioners**. p.327, 1975.

KUTZLER, M. A. Semen collection in the dog. **Theriogenology** 2005

MOTA-FILHO, A.C. Conservação de sêmen canino sob refrigeração em diferentes caixas isotérmicas. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.3, p.78-83, 2007

NAGAO, J.F., MARTINS, M.I.M., PADILHA, L.C. & SAVI, P.A.P. Características morfofuncionais de espermatozoides caninos mantidos em "containers" para transporte refrigerado de sêmen, utilizando o diluente "Botu-Sêmen®". In:

Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Anais... Curitiba: CBRA, p.186, 2007.

NASCIMENTO, M.V. Packaging of canine semen for transport using different extenders. **Ciencia animal**, 2007.

NELSON, R.W. e COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. Parte 8, cap. 60, p.950-957. 4ªed. Elsevier, 2010.

PINTO, C.R.F., Paccamonti, D.L. & Eilts, B.E. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. **Theriogenology**, 52:609-616, 1999.

PONGLOWHAPAN, S., Essén-Gustavsson, B., & Linde-Forsberg, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, 62:1498-1517, 2004

RAMOS, R.P. Efeito da renovação do diluidor na viabilidade do sêmen canino refrigerado. **XIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX 2013 – UFRPE**.

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

ROTA, A., Strom B. and C. Linde-Forsberg | Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. **Butterworth Heinemann**, 1995

ROTA, A., Peña, A.I., Linde-Forsberg, C. & Rodriguez-Martinez, H. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. **Animal Reproduction Science**. 57:199-215, 1999.

SILVA, A. R. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** – artigo de revisão, 2003.

SILVA, A. R., Satzinger, S., Leite, L. G. & Silva L. D. M. 2004. **Gestação obtida por inseminação artificial com sêmen canino refrigerado transportado à distância** – relato de caso. *Clin. Vet.* 50: 56-66.

SOARES, M.P. Etilenoglicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural** vol. 32, n.4, 2002.

STROM_HOLST, B, Larsson, B., Linde-Forsberg, C. & Rodriguez-Martinez, H. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. **Journal of Reproduction & Fertility**. 119:201-206, 2000.

STROM HOLST, B. In vitro characterisation of cryopreserved canine spermatozoa with special reference to postthaw time and zona pellucida binding

capacity. **Doctor's dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences**, 1999.

VERSTEGEN, J.P., Onclin, K. & Iguer-Ouada, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg-yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, 64:720-733, 2005.

VIDIGAL, K.F. Integridade de funcionalidade da membrana plasmática, acrossomo e mitocôndrias espermáticas em caprinos segundo a formação escrotal. 2008.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science** 60-61:349-355, 200.

ZÙCCARI, C.E.S.N. Correlação entre métodos de avaliação de integridade de membrana plasmática do espermatozoide bovino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.3, p 678-684 jul/set, 2009.

PARTE II – Relatório de Estágio

Este relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular, realizado na *University of Illinois at Urbana-Champaign*, nos Estados Unidos da América sob orientação do Dr. Igor Frederico Canisso (DVM, MSc, PhD, DACT, DECAR at Equine Reproduction), no período compreendido entre 01 de abril e 26 de Junho de 2015, na área de reprodução de equinos.

8. INTRODUÇÃO

A University of Illinois foi fundada em 1867, possui cerca de 32 mil estudantes. Localizada na cidade de Urbana-Champaign no estado de Illinois dos Estados Unidos da América. Considerada uma das maiores e melhores universidades do mundo, dispõe de amplo e equipado hospital veterinário dividido em duas alas: *Small Animals* (Pequenos animais) e *Large Animals* (Grande Animais) que, junto com um prédio de laboratórios e salas de aula e uma fazenda, compõem a Escola de Medicina Veterinária.

A ala de grandes animais é composta de quadro enfermarias: a primeira (word 1) para acompanhamento clínico de ruminantes e suínos de clientes, a segunda (word 2) para acompanhamento clínico de equinos de clientes, a terceira (word 3) para alojamento e acompanhamento de animais de pesquisa e a quarta (word 4) destinada a reprodução equina. Além das enfermarias, a ala possui uma grande sala de recepção, dois centros cirúrgicos (um para equinos e outro para ruminantes), três salas de recuperação anestésica e uma sala para raio-x e tomografia. Os piquetes ao redor do hospital, são usados para manutenção de animais de pesquisa ao ar livre.

A enfermaria 4 possui baias grandes equipadas com câmeras de vídeo destinadas para acompanhamento de éguas prenhas e/ou recém paridas e baias menores para alojamento de garanhões e éguas para acompanhamento folicular, também possui um manequim para coleta de sêmen e um pequeno laboratório equipado com microscópio, lupa, centrífuga e outros materiais necessários na reprodução.

9. QUADRO DE ATIVIDADES

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	
ATIVIDADE	QUANTIDADE
Controle folicular	250
Protocolo hormonal em éguas em anestro	50
Coleta de sêmen	80
Congelamento de sêmen	12
Inseminação artificial	300
Colheita de embrião	10
Citologia e cultura bacteriana uterina	5
Inovulação de embrião	1
Diagnóstico de gestação	260
Parto distócico	6
Retenção de Placenta	12
Torção testicular	1
Cirurgia de Caslick	14

10. DESCRIÇÃO DE ATIVIDADES

As avaliações foliculares e diagnósticos precoces de gestação foram feitos por meio de palpação retal e ultrassonografia retal com aparelho portátil da marca Sonosite. A contenção da éguas foi feita por meio do uso de sedativo (Xilazina) e/ou brete de contenção.

Os partos distócicos foram tratados com anestesia peridural na base da calda e manobras obstétricas com auxílio de correntes obstétricas.

O Tratamento das retenções de placenta se deu por meio de infusão de água na artéria umbilical para descolamento da mesma do útero e lavagens

uterinas a cada 3 ou 6 horas para remoção de debris e restos placentários (dependendo da quantidade de placenta retida), além de aplicação de ocitocina a cada 4 horas até eliminação total e limpeza do útero.

Um dos casos avaliados foi de suspeita de torção testicular ou degeneração por infecção através de exame ultrassonográfico, mas o diagnóstico final foi realizado após a remoção cirúrgica do testículo.

Como não há tratamento para galactorrêia, foi feito armazenamento de colostro de outras éguas e acompanhamento do parto e do potro.

As coletas de sêmen são realizadas com a vagina artificial modelo Missouri e uso de manequim com égua ao lado ou urina de égua em estro para estimular o garanhão.

As cirurgias de Caslick foram realizadas em éguas com má formação perineal e/ou que constituíam 25% ou mais da abertura vulvar acima do assoalho da pelve.

Também foram realizados exames vaginoscópicos, cultura bacteriana uterina, citologia vaginal, uterina e biópsia de endométrio em éguas com dificuldade de emprenhar (após duas inseminações sem sucesso).

Além dos pacientes assistidos, houve participação e desenvolvimento de projetos científicos: Uso de GnRH e HCG para diagnóstico de criptorquidismo; uso de enrofloxacin em égua gestante; congelamento de sêmen com urospermia; avaliação de plasmotoxicidade seminal.

11. CONCLUSÃO

O estágio curricular é de extrema importância para a formação do profissional na carreira em Medicina Veterinária. A vivência prática do trabalho antes da formação acadêmica proporciona preparação e auto-confiança no Mercado de trabalho. Pessoalmente, adquiri experiência não só na parte profissional como também de vida e me sinto pronta para me tornar Médica Veterinária.