



**Universidade Estadual do Maranhão – UEMA
Centro de Ciências Agrárias – CCA
Curso de Medicina Veterinária
Departamento das Clínicas**

Júlia Faconi Ribeiro

Avaliação de sêmen resfriado de cães da raça Fila Brasileiro

São Luís

2022



Universidade Estadual do Maranhão – UEMA
Centro de Ciências Agrárias – CCA
Curso de Medicina Veterinária
Departamento das Clínicas

Júlia Faconi Ribeiro

Avaliação de sêmen resfriado de cães da raça Fila Brasileiro

Trabalho apresentado a Universidade Estadual do Maranhão como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Prof. Orientador: Felipe de Jesus Moraes Junior

Coorientador: Sérgio Henrique Costa Júnior

São Luís

2022

Ribeiro, Júlia Faconi.

Análise de sêmen de cães Fila Brasileiro / Júlia Faconi Ribeiro. – São Luis, 2022.

55 f

Monografia (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior.

1.Material genético. 2.Andrologia. 3.Machos. I Título.

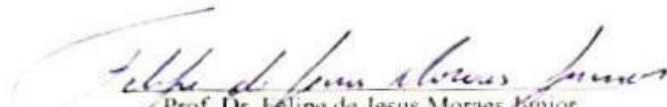
CDU: 636.7.082(81)

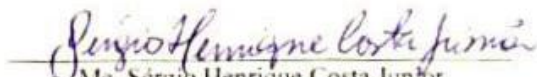
Julia Faconi Ribeiro

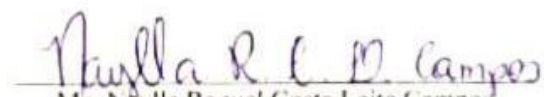
Avaliação do sêmen resfriado de cães da raça Fila Brasileiro

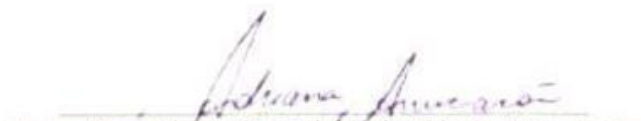
São Luis, 11 de julho de 2022

Banca Examinadora


Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior
Orientador
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA


Me. Sérgio Henrique Costa Junior
Coorientador
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA


Me. Náylla Raquel Costa Leite Campos
Banca
Universidade Estadual do Maranhão


Profa. Dra. Adriana Raquel da Almeida da Anunciação
Banca
Universidade Estadual do Maranhão

Dedico esse trabalho a todos os criadores de cães, médicos veterinários e admiradores da raça Fila Brasileiro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao Felipe e Sérgio por me ajudarem literalmente durante cada passo do meu trabalho. Obrigada por cada mensagem respondida, cada domingo de trabalho, por escutarem meus desabafos e não me deixarem desistir. Obrigada por cada pequeno ensinamento como regular o microscópio, que acreditem, perdi uma coleta por não saber, até grandes ensinamentos, como uma inseminação. Obrigada por estarem presentes em cada coleta em cima da hora, por me ensinarem a fazer esfregaço e por me emprestarem material, aliás, obrigada Felipe por confiar a mim seu bem mais importante, o microscópio. Enfim, obrigada por dedicarem um pouco da vida corrida de vocês para ajudarem uma colega, são raras as pessoas que desprenderiam tanta dedicação somente para ajudar alguém. Saibam que eu admiro muito vocês tanto como profissionais como pessoas, que vocês nunca percam essa essência, humildade e amor pelo que fazem, vocês com certeza são o meu exemplo.

Agradeço a Naylla, Natália e Leandra por também me ajudarem a execução do trabalho, esse trabalho nunca seria concluído sem a ajuda de vocês, tenham certeza que vocês são excelentes profissionais e espero de coração que todos alcancem os seus maiores objetivos e metas.

Agradeço imensamente ao Sr. Fernando do Canil do Oleiro, ao Sr. Alarico do Canil Guaraciara e ao Sr. Ernani do canil Ruffus Ranch por abrirem as portas dos seus canis, disponibilizarem seus animais para o estudo e nos receber tão bem.

Agradeço a minha família pelo amor, paciência, compreensão, incentivo durante todos esses anos de graduação e especialmente neste período de conclusão de curso. Obrigada mãe por pegar minhas dores, se preocupar comigo e não cobrar que eu lave a louça. Obrigada pai por sempre escutar meus problemas e me incentivar a continuar. Obrigada Clara por ser minha companheira e por lavar a louça por mim. Vocês são a minha base.

Agradeço ao meu namorado Alderico por me amar, me apoiar, me compreender, me fornecer comida, me permitir usar seu whatsapp como álbum de fotos e ter muita paciência comigo nesse período, especialmente nas madrugadas em que passamos analisando sêmen.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Felipe de Moraes Júnior por concordar com a minha ideia de pesquisa e apoiar o meu primeiro paço na reprodução de cães. Obrigada também por esses cinco anos como meu orientador, foram anos decisivos para minha carreira.

Agradeço a equipe do Laboratório de Reprodução Animal- LABRA por toda ajuda e compreensão durante a execução do trabalho e também aqueles que não fazem mais parte do laboratório, mas foram essenciais durante esses anos.

Agradeço ao meu cachorro Ozzy por todo carinho, companheirismo e algumas mordidas.

Agradeço a minha família que está de longe torcendo por mim. Em especial, Tia Valéria, tia Kely, tio Paulinho, Bruna, Danilo, Polyanna, Mel, Manu, Vó Tereza, Madrinha Sirlei.

Agradeço ao meu avô Pedro Faconi, que não está mais entre nós e minha vó Sebastiana Faconi. Obrigada por me ensinarem a amar, respeitar e cuidar dos outros e também importância da humildade, empatia e amor ao próximo. Sou imensamente grata por me acolherem como neta e me criarem com todo amor, dedicação e preocupação do mundo, saiba que tudo que fizeram por mim foi essencial para hoje eu ser a pessoa que me tornei.

“Eu sou da terra do samba,
da cachaça e futebol;
minha ginga - meu balanço -
capoeira - arrebol...
Tenho candomblé no sangue,
macumba no coração!
Sou todo Fidelidade,
Sou chamado Furacão!
No meu gingado brejeiro
Causo dor de cotovelo
e mostro com muito zelo
que sou FILA BRASILEIRO!”

Bingo da cachoeira

RESUMO

O resfriamento do sêmen canino em caixas de isopor é de importância para médicos veterinários e criadores pois permite o deslocamento do material genético aumentando seu tempo de viabilidade, porém a determinação do período máximo que o sêmen deve permanecer é inexistente. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da qualidade do sêmen resfriado de cães da raça Fila Brasileiro. Foram avaliados seis cães Fila Brasileiro através do exame andrológico composto por anamnese, exame físico completo, exame específico do sistema reprodutor e espermograma, sendo realizadas análises de motilidade, vigor, morfologia e concentração. As análises de motilidade e vigor foram feitas por método subjetivo. A análise de concentração foi avaliada através da contagem de células realizada ao microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubauer. Para análise de morfologia, foi utilizado o método de microscopia óptica através do esfregaço corado por Panótico® rápido, contando 200 células e classificando-as em normais, com defeitos maiores e com defeitos menores. A coleta do sêmen foi feita através do método de manipulação digital do bulbo do pênis, foi utilizada somente a fração espermática para experimento. O sêmen foi diluído com diluidor BotuDog® e resfriado em caixas de isopor BotuFlex®. Após 24h, 36h e 48h do início de resfriamento foram realizadas análises de motilidade, vigor e morfologia, para isso foram retiradas amostras de sêmen e colocadas em banho-maria. Para análises de morfologia e concentração, o sêmen fresco e o resfriado foram conservados em formol salina. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a idade, cães com menos de 1,5 anos e cães com 3,5 anos ou mais. De acordo com o exame andrológico, os animais eram aptos a reprodução. O sêmen fresco dos cães estava dentro dos padrões propostos pela CBRA (2013). Houveram diferenças estatísticas entre grupos no parâmetro vigor fresco, porém o vigor de ambos estava dentro do padrão da CBRA (2013). Houve mais de 30% de defeitos totais em sêmen resfriado por 24h do grupo de cães com 3,5 anos ou mais, de acordo com a CBRA (2013) não está dentro dos padrões para a espécie, porém devido a maior quantidade de defeitos menores do que maiores, conclui-se que seja devido a problemas na realização da técnica. O sêmen de ambos os grupos perdeu a qualidade durante o decorrer do resfriamento, o método de resfriamento em caixa de isopor mostrou-se eficiente em até 24h. São necessários mais estudos sobre o resfriamento e andrologia de cães Fila Brasileiro.

Palavras Chave: Material genético; Andrologia; Machos.

ABSTRACT

The cooling of canine semen in styrofoam boxes is important for veterinarians and breeders as it allows the displacement of genetic material, increasing its viability time, but the determination of the maximum period that the semen should remain is non-existent. The present study aimed to evaluate the quality of cooled semen of Fila Brasileiro dogs. Six Fila Brasileiro dogs were evaluated through andrological examination consisting of anamnesis, complete physical examination, specific examination of the reproductive system and spermogram, with analyzes of motility, vigor, morphology and concentration. Motility and vigor analyzes were performed using a subjective method. The concentration analysis was evaluated through the cell count performed under an optical microscope with the aid of a Neubauer camera. For morphology analysis, the optical microscopy method was used through the rapid Panótico® smear, counting 200 cells and classifying them as normal, with major defects and with minor defects. The semen collection was done through the method of digital manipulation of the bulb of the penis, only the sperm fraction was used for the experiment. The semen was diluted with BotuDog® extender and cooled in BotuFlex® Styrofoam boxes. After 24h, 36h and 48h of the beginning of cooling, analyzes of motility, vigor and morphology were performed, for which semen samples were taken and placed in a water bath. For morphology and concentration analyses, fresh and cooled semen were preserved in saline formaldehyde. The animals were divided into two groups according to age, dogs younger than 1.5 years and dogs 3.5 years and older. According to the andrological examination, the animals were capable of reproduction. The fresh semen of the dogs was within the standards proposed by the CBRA (2013). There were statistical differences between groups in the fresh vigor parameter, but the vigor of both was within the CBRA standard (2013). There were more than 30% of total defects in semen cooled for 24 hours in the group of dogs aged 3.5 years or older, according to the CBRA (2013) this is not within the standards for the species, but due to the greater amount of minor defects. than larger, it is concluded that it is due to problems in performing the technique. The semen of both groups lost quality during the course of cooling, the method of cooling in a styrofoam box proved to be efficient in up to 24 h. More studies are needed on the cooling and andrology of Fila Brasileiro dogs.

Key Words: Genetic material; Andrology; Males.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Coleta de sêmen de cão Fila Brasileiro através do método de manipulação digital do bulbo do pênis com auxílio de funil e tubo Falcon de 15mL.....20
- Figura 2.** Câmara de Neubauer com espermatozoides sob microscopia óptica com aumento de 40X, para avaliação da concentração espermática de cães Fila Brasileiro.21
- Figura 3.** Sêmen diluído com diluidor BotuDogTurbo®; Caixa BotuFLEX® com 2 barras de gelo e saco plástico com água. Utensílios para resfriamento de sêmen a 5°C, de acordo com o manual da BOTUPHARMA (2022).22
- Figura 4.** Sêmen de coloração branco opalescente, de cão Fila Brasileiro, em tubo Falcon de 15 mL, imediatamente após a coleta.....24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análises do volume, motilidade, vigor e concentração do sêmen imediatamente após a coleta (fresco) de cães Fila Brasileiro.....	25
Tabela 2. Análises de motilidade e concentração 24h, 36h e 48h após o início do resfriamento do sêmen de cães raça Fila Brasileiro, diluído em BotuDogTurbo® e resfriado em caixas BotuFLEX®.	26
Tabela 3. Morfologia do sêmen imediatamente após a coleta (fresco) de cães da raça Fila Brasileiro: defeitos totais, defeitos menores e defeitos maiores dos espermatozoides.	28
Tabela 4. Morfologia do sêmen diluído em BotuDogTurbo® de cães da raça Fila Brasileiro, 24h após o começo do resfriamento, em caixas de isopor BotuFLEX®: defeitos totais, defeitos menores e defeitos maiores dos espermatozoides.	29
Tabela 5. Morfologia do sêmen diluído em BotuDogTurbo® de cães da raça Fila Brasileiro, 36h após o começo do resfriamento, em caixas de isopor BotuFLEX®: defeitos totais, defeitos menores e defeitos maiores dos espermatozoides.	30
Tabela 6. Morfologia do sêmen diluído em BotuDogTurbo® de cães da raça Fila Brasileiro, 48h após o começo do resfriamento, em caixas de isopor BotuFLEX®: defeitos totais, defeitos menores e defeitos maiores dos espermatozoides.	30

LISTA DE SIGLAS

ABP	Proteínas ligadoras de andrógenos
ACP®	Água de coco em pó
BHT	Hidroxitolueno butilado
CASA	Computer Analysis System
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
FCI	Federação Internacional de Cinofilia
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GNRA	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
IA	Inseminação Artificial
LDL	Lipoproteínas de baixa intensidade
LH	Hormônio Luteinizante
MA	Maranhão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 JUSTIFICATIVA	3
3 OBJETIVOS	4
3.1 Geral	4
3.1 Específicos	4
4 REFERÊNCIAL TEORICO	5
4.1 Eixo Hipotalâmico Hipofisário Gonadal	5
4.2 Espermatogênese	6
4.3 Exame andrológico	7
4.3.1 Anamnese	7
4.3.2 Exame Físico	8
4.3.3 Comportamento sexual	9
4.3.4 Espermograma	9
4.3.4.1 Coleta de sêmen	10
4.3.4.2 Análise seminal.....	11
4.4 Resfriamento do sêmen canino	14
4.5 Diluentes	15
4.6 Fila Brasileiro	17
5 METODOLOGIA.....	19
5.1 Avaliação dos Animais	19
5.2 Coleta do sêmen.....	19
5.3 Avaliação seminal.....	20
5.3.1 Análises de Motilidade e Vigor	20
5.3.2 Análises de Concentração e Morfologia.....	20
5.4 Diluição e resfriamento do Sêmen.....	21
5.5 Análises do sêmen resfriado	22

5.6 Comitê de Ética.....	23
5.7 Análises Estatísticas.....	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
8. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

Os cães fazem parte das atividades humanas e evoluíram junto ao homem de acordo com suas atividades, cultura e psicologia, as diferenças entre raças permitem que o homem tenha um companheiro que atenda suas necessidades, como por exemplo as raças voltadas para o pastoreio e raças guias. Para se obter um animal de raça todos os seus ancestrais devem ser desta raça e para isso é necessário o acasalamento (MARITI et al., 2012).

A monta natural de cães da mesma raça nem sempre é possível pois há fatores como a diferença de tamanhos, barreiras patológicas, a aceitação do macho pela fêmea e principalmente a distância entre os animais (SILVA et al., 1996). Com isso, além da monta natural outro método de procriação é a inseminação artificial (SILVA et al., 2003).

A inseminação artificial (IA) em cadelas pode ser feita através de duas técnicas, pela deposição do sêmen no útero (intrauterina) ou pela deposição de sêmen na vagina (intravaginal) (SILVA et al, 2003). A IA pode ser feita através de sêmen fresco, congelado ou resfriado, o sêmen fresco é utilizado assim que coletado do macho, o método de criopreservação e resfriamento são utilizados para conservação do sêmen (WITTAYARAT et al., 2012; FUTINO et al., 2010).

Para a coleta do sêmen utiliza-se o método de eletroejaculação e o método de manipulação digital através da massagem do bulbo da glândula do pênis, sendo o último mais utilizado (JOHNSTON et al., 2001).

O resfriamento de sêmen canino é de interesse de médicos veterinários e criadores pois através dele é possível o transporte do material genético entre regiões distantes, sem o deslocamento dos animais. O resfriamento pode ser realizado através do uso de refrigeradores convencionais ou através de caixas de isopor (LINDE-FORSBERG, 2001; SILVA et al, 2004; UCHOA et al., 2007). Uma importante desvantagem da técnica é a queda de viabilidade do sêmen ao decorrer do tempo (ENGLAND E PONZIO, 1996).

O resfriamento através de caixas de isopor possui baixo custo e se mostra interessante quando se refere ao transporte de sêmen (NASCIMENTO, 2007). A caixa de isopor BotuFLEX® é uma caixa comercial utilizada amplamente no cotidiano de criadores e veterinários para o transporte de sêmen principalmente de equinos e caninos através do resfriamento, para a sua utilização há um manual de instruções, não sendo uma caixa de isopor comum (BOTUPHARMA, 2022). Apesar de serem muito utilizadas, os

estudos com cães mostrando a determinação do período máximo de conservação nesses recipientes são praticamente inexistentes (NASCIMENTO, 2007).

Os diluidores são substâncias adicionadas ao sêmen para ajudar em sua preservação durante o processo de resfriamento, congelamento e descongelamento, evitando danos aos espermatozoides caninos e prolongando sua longevidade. O diluente ideal deve conter nutrientes para os espermatozoides. Há dois tipos de diluidores, os diluidores produzidos em laboratório e os diluidores comerciais (RODRIGUES, 1997).

O exame andrológico é de extrema importância para a avaliação e definição do potencial reprodutivo dos machos, o método consiste em avaliação física completa do animal, avaliação dos órgãos reprodutivos, análise do comportamento sexual e análises espermáticas. Quanto as análises espermáticas, elas consistem em análises macroscópicas, compostas por avaliação de coloração, aspecto, odor e volume e análises microscópicas compostas por motilidade, vigor, concentração e morfologia. As análises espermáticas também são utilizadas após resfriamento e congelamento do sêmen para avaliar o potencial de fertilização dos espermatozoides (CBRA, 2013).

A raça Fila Brasileiro foi reconhecida a poucos anos como a primeira raça de cães grande porte brasileira e tem grande importância para a história do Brasil pelos animais serem descendentes de raças trazidas pelos colonizadores e fazerem parte de todo processo de formação do país. São cães com aptidão para guarda e manejo do gado e são extremamente fieis a seus donos (VALLE & MONTE, 1981). Há poucos estudos sobre andrologia e resfriamento de sêmen de machos Fila brasileiro.

2 JUSTIFICATIVA

O uso de caixas de isopor para o resfriamento do sêmen canino é um método bastante utilizado a campo para conservação da sua viabilidade, contudo, há poucos estudos sobre o impacto desse tipo de recipiente na qualidade seminal.

Sabe-se que o sêmen resfriado deve ser utilizado na inseminação artificial o mais rápido possível para garantir sua viabilidade, já que o resfriamento do sêmen de animais aptos a reprodução leva a diminuição da qualidade espermática. Podem haver problemas no transporte da caixa, causando demora no processo, como por exemplo, atraso dos voos e a lentidão do trânsito nas cidades.

A avaliação seminal é de extrema importância na verificação da qualidade física e estrutural da célula espermática, sendo estas características de impacto na fertilidade do material. Deve-se também levar em consideração os danos que a alteração de temperatura pode causar no sêmen, bem como o tempo de exposição ao resfriamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliação da qualidade do sêmen resfriado de cães da raça Fila Brasileiro.

3.1 Específicos

- Analisar o sêmen de cães da raça Fila Brasileiro, imediatamente após a coleta, quanto a motilidade, vigor, morfologia e concentração dos espermatozoides;
- Avaliar o sêmen de cães da raça Fila Brasileiro nos períodos de 24h, 36h e 48h após o início da refrigeração, quanto a motilidade, vigor e morfologia dos espermatozoides;
- Avaliar cães da raça Fila Brasileiro quanto a aptidão reprodutiva através de exame andrológico completo;
- Comparar espermograma de cães Fila Brasileiro de diferentes idades.

4 REFERÊNCIAL TEORICO

4.1 Eixo Hipotalâmico Hipofisário Gonadal

O sistema reprodutivo dos machos é regulado por meio de feedback negativo envolvendo hipotálamo, hipófise anterior e testículos (KLEIN, 2014).

O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofina (GNRH) que estimula a hipófise anterior a sintetizar e secretar hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (KLEIN, 2014).

A liberação de FSH e LH dependem do padrão de pulsatilidade do GNRH, pulsos irregulares e de baixa amplitude liberam FSH, pulsos de alta frequência induzem a liberação de LH. A subunidade proteica (α) encontrada nesses hormônios são comuns entre ambos, porém a subunidade (β) são específicas de cada um (KLEIN, 2014).

O LH age nos testículos através da ligação a receptores da membrana das células de Leydig, estimulando a conversão de colesterol no hormônio testosterona. As células de Sertoli produzem proteínas ligadoras de andrógenos (ABP), essas proteínas se ligam aos andrógenos que foram sintetizados nos testículos quando estes são difundidos para sangue e linfa. A espermatogênese depende desses andrógenos para acontecer de forma normal (KLEIN, 2014).

As ABP promovem o acúmulo da di-hidrotestosterona e testosterona dentro dos túbulos seminíferos e no interstício testicular e facilitam o transporte de andrógenos do testículo para o epidídimo, a importância desse fator está no fato de influenciar no trânsito epididimal e maturação das células espermáticas (KLEIN, 2014).

As células de Sertoli e as células mioides peritubulares encontradas nos testículos dão suporte e envolvem as células espermáticas durante o desenvolvimento sendo então alvos da testosterona. O FSH tem como alvo específico as células de Sertoli nos túbulos seminíferos, junto com a testosterona o FSH estimula funções que estão envolvidas com o fornecimento de nutrientes aos espermatozoides, maturação dos espermatócitos, meiose, espermição e funções das células de Leydig, como a síntese e secreção de inibina, ABP, ativina e estrógeno (KLEIN, 2014).

Pesquisas apontam que as células de Leydig e células de Sertoli agem de modo parácrino. As células de Sertoli podem estimular a produção de esteroides nas células de Leydig, como a inibina, secretada pelas células de Sertoli devido ao alto nível de FSH, estimula a esteroidogênese nas células de Leydig (KLEIN, 2014).

A inibina junto com a testosterona faz parte do mecanismo de feedback sobre a produção de FSH, os esteroides gonadais suprimem a liberação de FSH e a inibina mostra-se como a mais influente nesse mecanismo. A di-hidrotestosterona, o estrógeno e a testosterona fazem feedback negativo sobre a liberação e síntese de LH na hipófise anterior ou a nível de hipotálamo (KLEIN, 2014).

4.2 Espermatogênese

A espermatogênese é o processo de formação dos espermatozoides no trato reprodutivo dos machos. É caracterizada por três fases: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese. Na espermatocitogênese, as espermatogônias do tipo A (diploides), que são células primitivas, dividem entre si através do processo de mitose de forma a manter a população de células tronco, essas células são responsáveis pela produção de espermatozoides por toda a vida do animal. As espermatogônias do tipo A se transformam em espermatogônias do tipo B, essas células do tipo B através também do processo de mitose diferenciam em espermatócitos primários (KLEIN, 2014).

Os espermatócitos primários entram na primeira divisão meiótica, formando os espermatócitos secundários, células haploides. Os espermatócitos secundários passam pela segunda divisão meiótica formando as espermátides. Na primeira divisão meiótica ocorre a troca de material genético entre cromossomos devido ao pareamento de cromossomos homólogos gerando duas células de característica haploide (KLEIN, 2014).

As espermátides entram em fase de espermiogênese onde se diferenciam e se dividem em espermátides maduras, processo que ocorre antes da liberação de espermatozoides nos túbulos seminíferos. Na espermiogênese as principais características são, a formação do acrossoma a partir do complexo de Golgi, formação de flagelo, condensação e alongamento do núcleo e extensa perda de citoplasma (KLEIN, 2014).

O espermatozoide então, através do processo de espermição é constituído de cabeça, peça intermediária e cauda. Na cabeça contém o material genético masculino que em combinação com o material genético feminino constituído do oócito formará um embrião diploide após a fertilização. O acrossomo recobre a cabeça e possui enzimas hidrolíticas que possuem importante papel na penetração do oócito (KLEIN, 2014).

A peça intermediária é constituída de mitocôndrias importantes para a fornecer energia para locomoção do espermatozoide através da extensão dos microtúbulos pela calda e movimentação para frente e para trás (KLEIN, 2014).

A espermatogênese depende dos hormônios reprodutivos e pode ser afetada por patologias do sistema reprodutor, doenças sistêmicas e fatores ambientais.

A espermatogênese canina dura entre 50-60 dias levando em consideração o trânsito do epidídimo e o processo de formação das espermatogônias até espermatozoides (KLEIN, 2014).

4.3 Exame andrológico

O exame andrológico é essencial para a avaliação do potencial reprodutivo dos machos, ele se baseia na saúde geral do animal, saúde reprodutiva e saúde genética. Para a realização do exame andrológico deve-se iniciar com a identificação do proprietário e do animal, posteriormente anamnese, exame físico geral e específico do sistema reprodutor, comportamento sexual, espermograma, exames complementares e a emissão de laudo e se caso houver, o diagnóstico de patologias (CBRA, 2013).

4.3.1 Anamnese

Nessa etapa do exame andrológico deve-se coletar todas as informações possíveis do animal, como idade, histórico de patologias, histórico de vacinas e vermífugo, a alimentação oferecida, quanto se alimenta por dia, quantas vezes o alimento é oferecido, se é uma alimentação natural ou ração e se faz uso de suplementação. É importante se possível verificar o histórico genético dos ancestrais para verificar predisposição a patologias que podem passar aos descendentes. Além desses fatores é essencial verificar se o animal convive com outros animais, se passeia, faz viagens e se faz ou já fez o uso de medicamentos, além do uso de coleiras ou sprays repelentes (MEYERS-WALLEN, 1997 apud SANTOS et al., 2016).

Quanto a anamnese reprodutiva, é necessário direcionar de acordo com o motivo que levou o tutor a solicitar a andrologia (FELDMAN E NELSON, 2004, apud SANTOS et al., 2016). Questiona-se sobre o histórico reprodutivo, número de cópulas, sucesso ou insucesso da cópula, se utiliza-se monta natural ou inseminação artificial, quantas ninhadas o animal já teve, quantos animais por ninhada, índice de mortalidade dos filhotes, informações sobre as fêmeas usadas para o acasalamento (idade, prolificidade, fertilidade), entre outros. Se já coletado antes, saber sobre a qualidade seminal, avaliar

exames já feitos antes, como cultura e citologia de fluido seminal e sorologia de brucelose (JOHNSON et al., 2001).

De acordo com JOHNSON (2006), algumas medicações afetam diretamente a libido e a qualidade seminal, como por exemplo cimetidina, hormônios como glicocorticoides, estrógenos e andrógenos, espirinolactona, cetaconazol e anticolinérgicos.

4.3.2 Exame Físico

O exame físico deve ser dividido em exame geral e exame específico do sistema reprodutor.

O exame geral inclui a avaliação de todos os sistemas do animal, incluindo por exemplo, avaliação de hidratação, escore corporal, presença de ectoparasitas, se há queda ou opacidade dos pelos, claudicação, frequência cardíaca, alterações respiratórias, alterações neurológicas como convulsões, entre outros. Ele é essencial para descartar doenças hereditárias ou sistêmicas que podem afetar negativamente a fertilidade do macho, podendo até mesmo ser requisito para excluí-lo da reprodução (CBRA, 2013).

O exame específico envolve exame apenas do aparelho reprodutivo. O escroto possui uma mobilidade em relação aos testículos e espessura uniforme, não sendo normal haver aderências. O prepúcio deve ser facilmente tracionado para traz até o bulbo, sem sinais de fimose, pústulas, feridas. O pênis não deve apresentar sinais de inflamação, corpos estranhos, traumatismos, secreções excessivas e neoformações (FELDMAN e NELSON, 2004; CBRA, 2013).

Quanto ao epidídimo, cordões espermáticos e testículos, devem ser avaliados quanto a localização, dimensões, simetria, consistência, presença ou ausência, mobilidade e sensibilidade, os três devem ser avaliados juntos, sendo epidídimo e testículos de fácil diferenciação, caso não seja possível diferencia-los pode ser indício de anomalia (JOHNSON, 2006; CBRA, 2013).

As alterações testiculares congênitas mais comuns são, criptorquidismo (ausência de um ou ambos testículos no saco escrotal), hipoplasia testicular, agenesia de um testículo (monorquisimo) ou agenesia de ambos os testículos (anorquidismo) (ROMANGNOLI e SCHLAFER, 2006).

A próstata pode ser examinada por palpação abdominal e palpação retal simultaneamente. O tamanho da próstata varia de acordo com a idade, raça e peso do

macho. A disfunção prostática pode ser indicada através de anormalidades de tamanho, simetria entre lobos, sensibilidade a palpação ou consistência (FELDMAN E NELSON, 2004). Quanto a palpação retal a glândula apresenta textura ligeiramente áspera, com formato bilobado e simétrico (JOHNSON, 2006 apud SANTOS et al., 2016).

4.3.3 Comportamento sexual

O comportamento sexual é composto por todos os comportamentos que o macho demonstra na presença de uma fêmea em estro com o objetivo de acasalamento, em cães tem-se como exemplo, cheirar os órgãos genitais da fêmea e a tentativa de monta (YAMAMOTO, 2018).

A libido se caracteriza pela manifestação do interesse sexual dos machos pelas fêmeas por características hormonais, sendo uma característica fisiológica. Os andrógenos, principalmente a testosterona são responsáveis pela manutenção de características sexuais secundárias dos machos e comportamento sexual. A deficiência desses hormônios provoca queda da libido (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O comportamento sexual deve ser avaliado pois é extremamente importante para que aconteça a monta natural, podendo ser pré-requisito de avaliação de distúrbios hormonais, além de ser um fator genético que pode passar para os descendentes (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A libido do macho pode diminuir em animais idosos. Machos inexperientes sexualmente podem ser intimidados por cadelas experientes e dominantes ou caso estejam em ambientes estranhos. Para avaliação da libido, o animal preferencialmente deve estar na presença de uma fêmea no cio (CBRA, 2013; JOHNSON, 2006).

4.3.4 Espermograma

O espermograma é a análise do sêmen para avaliar o potencial e trato reprodutivo do macho além de afecções que podem excluí-lo da reprodução (MEYERS-WALLEN, 1997 apud SANTOS et al., 2016). É constituído pela coleta da fração espermática do sêmen canino e posterior avaliação através de diversos métodos (SILVA et al., 2002 apud SANTOS et al., 2016).

A avaliação deve ser macroscópica e microscópica, macroscopicamente deve-se avaliar a coloração, aspecto, odor e volume. Microscopicamente as análises são de

motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática (CBRA, 2013). Pode-se analisar também o pH da terceira fração (JOHNSTON et al., 2001 apud SANTOS et al., 2016), além do teste hiposmótico e testes mais dispendiosos e acurados como análise computadorizada, microscopia fluorescente e citometria de fluxo (SANTOS et al., 2016).

4.3.4.1 Coleta de sêmen

A coleta do sêmen pode ser feita através de dois métodos, método de manipulação digital, mais utilizado, através da massagem do bulbo da glândula até a ejaculação e o método de eletroejaculação. O método de eletroejaculação tem como desvantagem a possível contaminação do sêmen com urina e muitas vezes não é necessária sua utilização (JOHNSTON et al., 2001 apud SANTOS et al., 2016). Um ejaculado de melhor qualidade, a facilitação da coleta e da avaliação da libido acontece através da presença da fêmea, porém a coleta pode ser feita em sua ausência, pois o método de manipulação digital é suficiente para alguns machos (FELDMAN E NELSON, 2004; JOHNSTON et al., 2001).

O ambiente pode ser decisivo para o sucesso da coleta, o animal deve estar em um ambiente calmo, fresco e com piso antiderrapante para evitar acidentes (KRUSTRITZ, 2010 apud SANTOS et al., 2016).

O ejaculado canino é composto de três frações, sendo a primeira e a terceira fração prostática e a segunda fração espermática. A primeira fração tem como objetivo a limpeza da uretra, a terceira a diluição do sêmen e a segunda fração é composta pelos espermatozoides (fração espermática) (SILVA et al., 2002 apud SANTOS et al., 2016).

O cão promove impulsos vigorosos quando libera pequeno volume da primeira fração. A segunda fração (branca opalescente) é liberada após a diminuição ou cessão dos impulsos, o cão procura passar a pata pelo manipulador, como simulação de cópula, caso ele não faça, o manipulador deve levantar a perna do animal e tracionar o pênis 180° em direção caudal.

A terceira fração pode ser identificada através da liberação de líquido transparente após a liberação de líquido branco opalescente, visualização de contrações anais e palpação dos impulsos na região uretral (JOHNSTON et al., 2001 apud SANTOS et al., 2016). Após a coleta é importante não deixar o animal se deitar e mantê-lo sob vigia até o pênis ficar totalmente protegido pelo prepúcio, evitando lesões penianas.

4.3.4.2 Análise seminal

O volume pode variar de acordo com a raça, idade, frequência e porte do animal. As frações podem variar quanto ao volume. A primeira em geral é de 0,5 mL, a segunda 0,5 a 1 mL, podendo chegar a 3 ml e a terceira e última pode variar de 3 á 30 ml (SILVA et al., 2002 apud SANTOS et al., 2016). De acordo com JHONSTON et al., (2001) o volume total pode variar de 1 a 80 mL. Para JHONSON (2006) pode variar de 2,5 a 80 mL e de acordo com a CBRA (2013), pode variar de 1,5 a 80 mL. O volume total é importante para o cálculo do número de espermatozoides (KRUSTRITZ, 2010 apud SANTOS et al., 2016).

Quanto ao aspecto e odor o odor é *sui generis* (CBRA, 2013) e o aspecto é viscoso devido a concentração espermática (SILVA, et al., 2012b apud SANTOS et al., 2016).

A coloração da fração espermática é branco opalescente, quando há anormalidades pode-se apresentar de coloração vermelha por presença de sangue; coloração amarela por presença de urina; coloração marrom por doença prostática; coloração muito clara como indicação de azoospermia; verde por infecção ou esmegma (KRUSTRITZ, 2010 apud SANTOS et al., 2016).

A motilidade espermática é o número de espermatozoides móveis (CBRA, 2013). Existem dois métodos de avaliação de motilidade, através da análise computadorizada ou de forma subjetiva pela microscopia óptica, sendo o último mais utilizado (CARDOSO et al., 2003; MARTINEZ, 2004 apud. SANTOS et al., 2016).

A avaliação de motilidade pode ser feita tanto em sêmen fresco como em sêmen resfriado e criopreservado (PEÑA, 1997 apud SANTOS et al., 2016) e tem como objetivo avaliar o potencial de fertilização, embora essa correlação não esteja totalmente esclarecida (SOUZA, 2003 apud SANTOS et al., 2016). É um dos métodos mais utilizados para a avaliação espermática e no cão o percentual de células morfolologicamente normais está relacionado com o percentual de espermatozoides móveis (AGARWAL et al., 2003 apud SANTOS et al., 2016).

A análise de microscopia óptica consiste em analisar a olho nu o percentual de espermatozoides móveis, para isso é necessária uma lâmina com uma gota de sêmen, coberta por uma lamínula. O aumento utilizado é de 100 ou 400X (NELSON e COUTO, 2015 apud SANTOS et al., 2016).

O número de espermatozoides caninos móveis deve variar de 80 a 90%, sendo a baixo de 60% considerado astenozoospermia, característica anormal (SILVA et al.,

2002). De acordo com a CBRA (2013), o sêmen canino fresco deve apresentar motilidade maior ou igual a 70% e o sêmen canino criopreservado maior ou igual a 50% para que sejam considerados de qualidade aceitável.

O vigor é a qualidade dos espermatozoides móveis, sendo avaliado em uma escala 1-5, sendo no mínimo 3, fresco ou congelado (CBRA, 2013) ou de 0-5 (SILVA et al., 2003 apud SANTOS et al., 2016). Os movimentos anormais dos espermatozoides como movimentos retrógrados ou em círculos podem ser devido a morfologia também anormal de calda e peça intermediária (JOHNSON, 2006 apud SANTOS et al., 2016).

A concentração espermática é quanto de espermatozoides tem em um mililitro de sêmen e é avaliada somente com a segunda fração pois é a única fração que possui espermatozoides.

Os métodos utilizados para a avaliar a concentração são, espectrofotometria, contagem de células por microscópio óptico ou de contraste com auxílio de câmara de Neubauer e método computadorizado (CBRA, 2013). A concentração espermática do cão varia entre $247 \pm 9,9 \cdot 10^6$ spz/mL (espermatozoides por mililitro) (SILVA et al., 2002 apud SANTOS et al., 2016).

A baixa concentração espermática (oligozoospermia), a diminuição do percentual de espermatozoides morfolologicamente normais (teratozoospermia) e a ausência de espermatozoides (azoospermia) podem acontecer em determinados casos (LUZ E SILVA, 2019).

A oligozoospermia é quando o animal possui baixa concentração espermática e pode ser identificada em cães geriátricos, imaturos e quando há esgotamento das reservas de ducto deferente e epidídimo (extragonadais), por excesso de coleta ou por ejaculação retrógrada. Na ejaculação retrógrada parte do sêmen flui para a vesícula urinária (JOHNSTON et al., 2001 apud SANTOS et al., 2016).

A azoospermia é a incapacidade de ejacular ou até mesmo produzir espermatozoides (JOHNSON, 2006 apud SANTOS et al., 2016), alguns cães não ejaculam a segunda fração por manipulação digital insuficiente, pela ausência de uma fêmea no cio ou até mesmo estresse e ansiedade (MEMON, 2007 apud SANTOS et al., 2016).

A Teratozoospermia é a diminuição do percentual de espermatozoides morfolologicamente normais e tem como principais causas, orquite, tumores testiculares, prostatite, hipertermia, abstinência sexual, obesidade e uso excessivo do animal em cópulas ou coletas de sêmen (LUZ E SILVA, 2019).

A morfologia espermática consiste na porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais em relação aos anormais, implica diretamente na fertilidade do macho, apesar desse fator não estar totalmente esclarecido em cães. É um método indispensável pois algumas anomalias atrapalham a motilidade espermática e conseqüentemente altera a fertilidade devido a incapacidade desses espermatozoides atingirem os oócitos (KRUSTRITZ, 2010; OETTLÉ, 1993).

Os métodos de avaliação morfológicos são o esfregaço úmido e o esfregaço corado. Um sêmen canino de qualidade deve ter no mínimo um percentual de 80% de espermatozoides normais (JOHNSTON, 2001 apud SANTOS et al., 2016). De acordo com a CBRA (2013), o sêmen fresco e criopreservado deve apresentar a porcentagem mínima de 70% de células normais.

Os defeitos espermáticos são classificados em primários e secundários, os primários são relacionados a espermatogênese, como formas de cabeça anômalas, estruturas duplicadas e gota citoplasmática proximal, já os secundários estão relacionados a manipulação (iatrogênica) e maturação, como por exemplo cabeça destacada, cauda enrolada e gota citoplasmática distal (KRUSTRITZ, 2010 apud SANTOS et al., 2016). Causas iatrogênicas incluem choque térmico e irregularidades em osmolaridade e pH, alto número de defeitos em calda e peça intermediária em sêmen com motilidade normal pode ser suspeita de causa iatrogênica (JOHNSON, 2006 apud SANTOS et al., 2016).

As anormalidades devem ser separadas quanto a localização, sendo em cabeça, peça intermediária e cauda (JOHNSON, 2006 apud SANTOS et al., 2016).

Quanto ao pH da fração prostática do sêmen canino, pode variar de 6,3 e 6,7 (JOHNSTON et al., 2001 apud SANTOS et al., 2016.).

Outros testes que também podem ser utilizados para a avaliação seminal canina são, o teste hiposmótico, integridade de cromática espermática, integridade de acrossomo e capacitação espermática.

Exames de imagem, biopsia, exames microbiológicos, dosagens de fosfatase alcalina no plasma seminal, dosagens hormonais e cariotipagem, são exames complementares que podem auxiliar no diagnóstico.

A partir dos resultados de todo exame andrológico um laudo pode ser emitido e também um diagnóstico caso haja alguma patologia. O reprodutor pode ser classificado em apto, questionável ou inapto a reprodução (CBRA, 2013).

4.4 Resfriamento do sêmen canino

Existem dois meios de transportar o sêmen, através da criopreservação, onde os espermatozoides podem ser utilizados por tempo indeterminado e o resfriamento, o qual deve ser utilizado o mais rápido possível para a inseminação (ENGLAND E PONZIO, 1996).

A criopreservação do sêmen canino ganhou popularidade devido ao aumento por demanda de transporte de material genético entre cidades, estados e países. O transporte do sêmen reduz o estresse aos animais durante o coito e transporte, diminui os riscos de doenças e também os custos de envio (ENGLAND E PONZIO, 1996).

A primeira pessoa a relatar o sucesso do resfriamento do sêmen canino foi Rowson, enquanto Seager relatou a primeira gestação fruto de inseminação artificial (IA). Após essas descobertas surgiram vários estudos com métodos de resfriamento do material genético canino (ENGLAND E PONZIO, 1996).

As vantagens do método de resfriamento são que, quando reaquecido, o sêmen parece sofrer menos danificação do que no método de congelamento. No método de inseminação, as taxas de prenhez parecem ser maiores para o sêmen resfriado que do descongelado (ENGLAND E PONZIO, 1996).

A desvantagem do método de resfriamento é que durante o período de armazenamento do sêmen, a qualidade cai gradativamente, o que não acontece com o método de congelamento, então pode-se dizer que em determinado tempo a qualidade do sêmen resfriado é a mesma do sêmen congelado e depois desse tempo a qualidade do sêmen resfriado é menor que a do congelado (ENGLAND E PONZIO, 1996).

Os métodos de resfriamento de sêmen canino envolvem salas resfriadas, garrafas térmicas, refrigeradores comerciais, recipientes térmicos e caixas isotérmicas de poliestireno expandido. As caixas de isopor com gelo são alternativas baratas e viáveis para o resfriamento do sêmen canino, porém, são utilizações empíricas e estudos envolvendo o tempo máximo de refrigeração que o sêmen pode ser submetido sem perder a viabilidade para a IA, ainda não foram bem estabelecidos. O tempo de longevidade do sêmen resfriado em caixas de isopor quando conhecido permite uma melhor programação confiável para o envio das amostras (NASCIMENTO, 2007).

A BotuFLEX® é uma caixa feita com isopor utilizada comercialmente para o transporte de sêmen canino, é utilizada para realização de curvas adequadas de refrigeração, podendo ser na temperatura de 15°C, quando se utiliza apenas um gelo

comercial e a 5°C, quando se utiliza dois gelos comerciais. É considerado um método de baixo custo (BOTUPHARMA, 2022).

De acordo com o fabricante, mesmo em condições adversas, as temperaturas externas como por exemplo dos transportes aéreos, motoboys e rodoviários, intervêm pouco na temperatura da caixa devido a sua densidade e vedação, permitindo que o sêmen chegue ao destino final na temperatura adequada (BOTUPHARMA, 2022).

Com apenas um gelo, a curva de refrigeração cai de 30°C para 15°C em 5 horas, após as próximas 12 horas a temperatura se mantém em 15°C. Com dois gelos a temperatura cai de 27,5°C para 5°C em 5 horas, permanece a 5°C por 46 horas e a partir de 46h começa a subir (BOTUPHARMA, 2022).

As instruções de uso da BotuFLEX® envolvem: A caixa deve ser montada apenas no momento da utilização; Não se deve introduzir novas amostras quando já tiver amostras sendo resfriadas; Os gelos devem estar congelados a -20°C por no mínimo 24 horas antes do uso; O volume deve variar entre 150-200 mL para envio, caso seja necessário, preencher o resto do volume com um frasco com água para completar os 150-200 mL; Para transportar até 12h usar apenas um gelo, para transportar a cima de 12h usar dois gelos; Utilizando o diluidor BotuSÊMEN® gera melhores resultados; Com o diluidor BotuTURBO® deve-se utilizar a curva a 5°C; Nunca abrir a BotuFLEX® antes do destino final (BOTUPHARMA, 2022).

4.5 Diluentes

Os diluidores são substâncias adicionadas ao sêmen para ajudar em sua preservação durante o processo de resfriamento, congelamento e descongelamento, evitando danos aos espermatozoides caninos e prolongando sua longevidade (RODRIGUES, 1997).

O diluente ideal deve conter nutrientes para os espermatozoides, servir como tampão ajustando as alterações de pH, promover concentração de eletrólitos e pressão osmótica dentro do padrão, promover as células contra choque térmico durante o resfriamento e conter crioprotetores que protejam as células de danos no processo de criopreservação e descongelamento.

O metabolismo da célula espermática produz ions H^+ , sendo necessário portanto substâncias que removam esses íons para evitar a acidificação do meio e

consequentemente a diminuição da longevidade e capacidade fertilizante dos espermatozoides (RODRIGUES, 1997).

O TRIS é amplamente utilizado, é uma substância solúvel em água e possui atividade tamponante, atuando como tampão iônico bipolar em pH entre 7 e 9 (MC PHAIL E GOODMAN, 1984), atua na preservação da energia do espermatozoide através da redução do metabolismo da frutose (RODRIGUES, 1997). Para o preparo do TRIS é necessária uma fonte de substrato energético fazendo a adição de um açúcar (ENGLAND, 1993).

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico - $C_6H_8O_7$) é utilizado na composição do TRIS, é encontrado em frutos cítricos, sendo um ácido inorgânico fraco que existe de forma anidra ou monohidratada (SILVA et al., 2002). Provavelmente seu mecanismo de atuação seja como antioxidante e na ajuda da manutenção do pH e na respiração da célula, quando em temperatura ambiente se encontra em pó cristalino branco (SILVA, 2005).

Os diluentes a base de água de coco são alternativas viáveis devido ao baixo custo, porém tem como desvantagens o fato de não ser possível armazenar a água por muito tempo devido a sua baixa longevidade, além da maioria dos frutos não ter as características necessárias para a fabricação do diluente, apresentando quantidades diferentes dos componentes, podendo prejudicar sua ação conservativa. Esses diluentes apresentam excelentes resultados após a descongelação do sêmen (SILVA et al., 2000; CARDOSO et al., 2003).

Uma alternativa as desvantagens apresentadas pelos frutos é a água de coco em pó (ACP®), que possui os mesmos constituintes da forma *in natura*, porém conservada com eficácia e padronizada, facilitando a utilização (CARDOSO et al., 2005).

A gema de ovo de galinha é uma alternativa para adição aos diluentes devido a sua ação protetora da membrana plasmática e restauração de fosfolípidios perdidos durante o processo de congelamento onde é gerado o choque térmico (HAMMERSTEDT et al., 1990). Acredita-se que o mecanismo protetor e de restauração seja conferida a presença de uma lipoproteína, a fosfatidilcolina que interage com a estrutura lipídica da membrana plasmática do espermatozoide e geram proteção ao choque térmico (BOUCHARD et al., 1990).

As desvantagens da gema do ovo estão na possibilidade de contaminação por ser um produto orgânico, além de promover facilidade de oxidação das células espermáticas, com possibilidade de peroxidação em lipídios insaturados (SILVA et al., 2002;

RODRIGUES, 1997). Como alternativa as desvantagens da gema do ovo há os análogos de hidroxitolueno butilado (BHT), lipídeos sintéticos que possuem ação protetora a membrana plasmática ao choque térmico (FARSTAD, 1996).

De acordo com FOULKES (1977), a fração de baixa densidade da gema do ovo, principalmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), aparentemente são as responsáveis pela proteção celular. Além de ser protetora, a gema do ovo contém proteínas importantes para a composição do diluente (SANTOS, 2004).

Outras substâncias utilizadas no processo de criopreservação são os crioprotetores. Os crioprotetores são classificados em dois tipos, intracelulares, que penetram dentro da célula e extracelulares, que permanecem fora da célula. Como exemplo de crioprotetores intracelulares tem-se o glicerol, etileno-glicol, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO) e como exemplo de crioprotetores que permanecem no meio extracelular tem-se os açúcares e proteínas. Os crioprotetores melhoram a sobrevivência durante a congelação e na descongelação dos espermatozoides (ENGLAND, 1993).

Durante o processo de coleta do sêmen o material fica propenso a contaminação pelas sujidades do trato reprodutivo (uretra, pênis e prepúcio) e do ambiente externo. Devido a esses fatores pode ser feita a assepsia e higiene de pênis e prepúcio antes da manipulação, além do uso de luvas pelo manipulador para diminuir os riscos.

As bactérias são prejudiciais a fertilidades dos espermatozoides devido as toxinas produzidas, a própria presença das bactérias, por degradação dos componentes do meio ou utilização de substratos metabólicos. Para evitar os riscos de contaminação tanto do sêmen quanto da cadela que será inseminada, a alternativa é adicionar aos diluentes os antimicrobianos (WATSON, 1990).

Outros diluentes amplamente utilizados são a base de leite desnatado, onde as lipoproteínas do leite interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas gerando proteção (BOUCHARD et al., 1990)

Os diluentes comerciais são alternativas viáveis para criadores e médicos veterinário, entre eles o BotuDogTurbo® da marca Botupharma cuja composição é desconhecida (BOTUPHARMA).

4.6 Fila Brasileiro

Os cães Fila Brasileiro são cães descendentes de cães trazidos pelos colonizadores para guarda e auxílio na captura de escravos, neste período não havia animais domésticos

em território brasileiro. Há várias teorias da origem dos filas, porém não são comprovadas (VALLE & MONTE, 1981).

O Dr. Paulo Santos Cruz estudioso da raça descreve três teorias. A primeira onde a raça se deriva de uma mistura entre Old English Mastiff e o Perdigueiro, a segunda seria uma raça trazida pelos portugueses e alterada pelo ambiente e a terceira a origem da raça seria pelo caldeamento do Mastiff, com Bloodhound e o Buldogue Inglês (VALLE & MONTE, 1981).

Há mais de três décadas são utilizados para o manejo do gado e a guarda das propriedades devido a sua valentia, temperamento forte e robustez. O nome fila vem do fato de obedecerem cegamente a seus donos. O “Brasil Kennel Clube” reconheceu a raça em 1946, sendo a primeira raça brasileira de grande porte reconhecida (VALLE & MONTE, 1981).

A raça Fila Brasileiro tem como aparência geral uma poderosa ossatura, figura compacta, retangular, harmoniosa e proporcional. Junto a massa muscular robusta há grande agilidade, concentrada e perceptível. É uma raça molossóide e os machos devem diferenciar-se das fêmeas de maneira nítida devido ao pronunciamento da feminilidade das fêmeas (FCI, 2016).

Quanto ao temperamento e comportamento, é de comportamento sereno, corajoso, determinado e valente, com autoconfiança e segurança própria, está sempre atento a ambientes e ruídos estranhos. Com seus donos mostra-se dócil, fiel, obediente e tolerante com crianças, porém possui aversão a estranhos e o manejo deve ser controlado principalmente em pistas de exposição. É muito fiel à guarda da propriedade e é dedicado em trabalhos como caça a animais de grande porte e serem líderes de gado.

Sua expressão quando está atento é de determinação com olhar firme e penetrante, porém em repouso mostra-se calmo e com expressão segura (FCI, 2016).

5 METODOLOGIA

5.1 Avaliação dos Animais

Três machos, da raça Fila Brasileiro do canil particular Guaraciara, localizado no município de Raposa – MA e três cães machos do canil particular Oleiro localizado no município de São José de Ribamar – MA, foram submetidos a um exame andrológico através da anamnese, exame físico geral e específico, avaliação do comportamento sexual e espermograma.

Os animais não tiveram alterações nas avaliações e foram considerados saudáveis e aptos a reprodução.

Todos os animais possuíam pedigree da raça Fila Brasileiro.

Quanto a alimentação, os cães do canil Guaraciara se alimentavam de mistura de rações diversas e frango, uma vez ao dia. Os cães do canil do Oleiro se alimentavam de ração super premium e carne, uma vez ao dia. Todos os animais tinham água disponível.

Todos os machos examinados já tiveram pelo ao menos uma ninhada, eram utilizados para reprodução e melhoramento genético com objetivo de melhorar a raça quanto aos padrões físicos e comportamentais, para exposições e venda. Cruzavam com fêmeas do próprio canil e fêmeas de outros canis e não havia uma linha de cruzamento quanto ao melhoramento genético, havendo a presença de consanguinidade. O canil Guaraciara utilizava monta natural e inseminação artificial para a reprodução, já o canil do Oleiro só utilizava monta natural.

O ambiente em que viviam era fresco, espaçoso e frequentemente limpo. Os cães de ambos os canis viviam em canis individuais ou com a presença uma fêmea, eram soltos uma vez ao dia para passeio individual para evitar brigas.

5.2 Coleta do sêmen

Os animais foram submetidos a uma coleta do sêmen por método de manipulação digital do bulbo peniano (figura 1), utilizando somente a fração espermática para o experimento. A coleta foi feita com os animais sobre pisos antiderrapantes e na presença de uma fêmea no cio. O material foi coletado em um funil de plástico acoplado a um tubo Falcon de 15mL, posteriormente foi colocado em banho maria na temperatura de 37°C.



Figura 1. Coleta de sêmen de cão Fila Brasileiro através do método de manipulação digital do bulbo do pênis com auxílio de funil e tubo Falcon de 15mL.

5.3 Avaliação seminal

A análise do sêmen foi feita por meio do exame macroscópico avaliando a coloração, aspecto, odor e volume e exames microscópicos constituídos por motilidade progressiva, vigor, concentração e morfologia.

5.3.1 Análises de Motilidade e Vigor

A motilidade progressiva é o número de espermatozoides móveis e o vigor é a qualidade do movimento dos espermatozoides móveis, ambos foram avaliados por meio do microscópio óptico por método subjetivo, sendo a motilidade ideal para espécie de 80%-90% (SILVA et al., 2002) e o parâmetro mínimo do vigor 3, em uma escala de 1-5 (CBRA, 2013). 10 μ L de sêmen foi colocado entre uma lâmina e uma lamínula pré-aquecidas a 37°C, imediatamente após a coleta.

5.3.2 Análises de Concentração e Morfologia

Como método de preservação da integridade dos espermatozoides, 10 μ L de sêmen foram diluídos em 190 μ L de formol salina para a realização das análises de morfologia e concentração (CBRA, 2013).

A concentração espermática é o número de espermatozoides por mililitro de sêmen e foi avaliada por meio da contagem de células realizada ao microscópio óptico

com auxílio da câmara de Neubauer (figura 2), para a espécie varia de $247 \pm 9,9 \cdot 10^6$ espermatozoides por mL (SILVA et al., 2002). A diluição do sêmen com formol salina na quantidade de 10 μ L foi colocada entre uma lamínula e a câmara de Neubauer e após 5min foi feita a contagem das células (CBRA, 2013).

Para a avaliação da morfologia foi utilizado o método de microscopia óptica por meio do esfregaço corado com Panótico® rápido. O esfregaço foi realizado com 10 μ L da diluição de sêmen com formol salina em lâmina fosca, após 5min de secagem as lâminas foram coradas e colocadas 1min em panótico rápido 1, 1min em panótico rápido 2 e 1min em panótico rápido 3, posteriormente as lâminas foram secas em temperatura ambiente.

Após coradas as células foram avaliadas em um microscópio com aumento de 40X sob óleo de imersão, contando e avaliando 200 células, classificando-as como normais, com defeitos maiores ou defeitos menores (BLOM, 1973). De acordo com a CBRA (2013), tanto sêmen fresco quanto congelado deve apresentar no mínimo 70% de células normais.

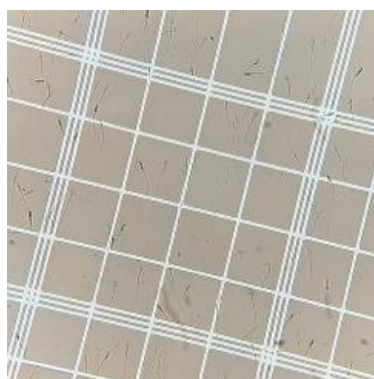


Figura 2. Câmara de Neubauer com espermatozoides sob microscopia óptica com aumento de 40X, para avaliação da concentração espermática de cães Fila Brasileiro.

5.4 Diluição e resfriamento do Sêmen

O sêmen dentro do padrão da espécie foi diluído em diluidor comercial BotuDogTurbo® sendo a diluição de 1:1 ou 2:1. O diluidor foi pré-aquecido em banho-maria em temperatura de 37,5°C.

Após a diluição as amostras foram colocadas em um tubo Falcon, identificadas e colocadas em uma caixa térmica de transporte BotuFLEX®.

Ao mesmo tempo que o tubo Falcon, foram colocadas duas barras de gelo e um saco plástico com a quantidade de água para completar o volume 100mL dentro da caixa,

começando uma curva de resfriamento com o objetivo de alcançar a temperatura de 5°C (figura 3). As barras de gelo inseridas foram congeladas 24h antes de serem colocadas na caixa. O cálculo da água utilizada foi através da formula: [100mL-Volume de sêmen (ml)].



Figura 3. Sêmen diluído com diluidor BotuDogTurbo®; Caixa BotuFLEX® com 2 barras de gelo e saco plástico com água. Utensílios para resfriamento de sêmen a 5°C, de acordo com o manual da BOTUPHARMA (2022).

5.5 Análises do sêmen resfriado

O sêmen então passou pela análise de motilidade, vigor e morfologia 24h, 36h e 48h após a refrigeração por meio dos mesmos métodos utilizados no sêmen fresco. A avaliação da concentração foi feita somente em sêmen fresco.

As análises após o resfriamento foram feitas do mesmo ejaculado através da abertura da caixa nos tempos determinados.

24h, 36h e 48h após o início do resfriamento foram retirados 20µL dos tubos Falcon e colocados em ependorfs individuais e identificados. Os ependorfs foram colocados em banho-maria na temperatura de 37,5 °C para a reativação das células espermáticas, simulando a temperatura do trato reprodutivo da fêmea.

Após esse período de tempo foram analisados vigor e motilidade de forma imediata. Para a avaliação de morfologia, 10µL de sêmen do ependorf após os 5min de banho maria foram colocados em 190µL de formol salina.

5.6 Comitê de Ética

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA de acordo com o protocolo 54-2021.

5.7 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados utilizando-se o pacote estatístico SAS (1997), para a obtenção de média e erros padrões dos parâmetros avaliados (concentração, vigor, motilidade, morfologia espermática). Foi utilizado o teste não paramétrico Wilcoxon, com probabilidade de 5%.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O exame físico geral e específico do sistema reprodutor não indicou nenhuma anormalidade, os animais estavam hidratados, mucosas normocoradas, temperatura, frequência cardíaca e respiratória dentro das normalidades.

Os animais foram classificados em 2 grupos, cães com menos 1,5 anos de idade (3 cães) e cães com 3,5 anos de idade ou mais que 3,5 anos de idade (3 cães).

Quanto ao exame macroscópico do sêmen, todos os animais apresentaram cor branca opalescente e odor *sui generis* dentro dos padrões da CBRA (2013), como mostra a figura 4.



Figura 4. Sêmen de coloração branco opalescente, de cão Fila Brasileiro, em tubo Falcon de 15 mL, imediatamente após a coleta.

Todos os machos do estudo responderam ao estímulo de manipulação digital e mostraram libido na presença de cadelas no cio.

O comportamento sexual junto a libido não tem correlação com a qualidade espermática, porém a deficiência de libido de touros mostrou comprometer a eficiência reprodutiva (CHENOWETH, 1980).

A libido dos machos em geral é um fator genético e limitante de acordo com a raça e idade, animais jovens podem demorar a expressarem interesse pela fêmea (BANE, 1954; OSBORNE et al., 1971). Pouco se sabe sobre a idade que os cães começam a demonstrar interesse pelas fêmeas.

NOGUEIRA (2018) relata a avaliação da libido de machos da raça Australian Cattle Dog e mostrou que todos os cães apresentaram libido em baixa ou alta intensidade e demonstraram comportamentos sexuais variados de acordo com as influências do ambiente.

A tabela 1 mostra as análises de volume, motilidade, vigor e concentração do sêmen logo após a coleta.

Tabela 1. Análises do volume, motilidade, vigor e concentração do sêmen imediatamente após a coleta (fresco) de cães Fila Brasileiro.

	Sêmen Fresco			
	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Concentração (Sptz/mL)
Cães < 1,5 anos	3,75 ± 0,25 ^a	86,66 ± 10,40 ^a	4,00 ± 0 ^a	182.10 ⁶ ± 45033,32 ^a
Cães ≥ 3,5 anos	2,50 ± 0,86 ^a	75,00 ± 5,00 ^a	3,00 ± 0 ^b	315666,67 ± 346779,95 ^a

Legenda: As letras ^a e ^b mostram as diferenças estatísticas. Houve diferença estatística significativa entre os grupos no parâmetro vigor.

Os parâmetros de motilidade e vigor foram avaliados juntos.

O único parâmetro com diferenças estatísticas significativas entre os grupos foi o vigor. Apesar de haver diferenças estatísticas, o vigor de ambos os grupos estava dentro das normalidades para um sêmen viável, de acordo com a CBRA (2013).

No trabalho de SILVA (2012a), 6 cães fila brasileiro com média de 2,5 anos apresentaram a média de vigor 5 na escala 0-5, o que não corrobora com o presente estudo, porém a escala utilizada no presente estudo foi de 1-5 (CBRA, 2013). De acordo com a CBRA (2013), o vigor mínimo que deve ser obtido pela espécie é 3.

O parâmetro motilidade do sêmen fresco também corrobora com o trabalho de SILVA (2012a), onde a média e desvio padrão foram 85,8 ± 3,7 %. O autor destaca as diferenças estatísticas significativas entre a motilidade, vigor e morfologia entre sêmen fresco e descongelado.

A motilidade é um dos parâmetros utilizados para avaliação de fertilização dos espermatozoides, por mais que essa correlação não esteja totalmente esclarecida (SOUZA, 2003).

O volume de sêmen obtido da fração espermática corrobora com o trabalho de SILVA (2012), que apresentou média e desvio padrão de 2,2 ± 1,3 mL.

De acordo com SILVA e LUZ, (2019) a concentração do sêmen canino é de aproximadamente 200 milhões de espermatozoides por mL. De acordo com SILVA et al. (2002), a quantidade mínima de espermatozoides para cães é de 247 ± 9,9 10⁶ por mL. Os resultados obtidos estão de acordo com os autores.

Apesar de muitos cães atingirem a puberdade precocemente (menos de 1 ano), a concentração seminal baixa é comum nesses casos e pode ser considerada normal.

A CBRA (2013) recomenda o método de contagem por cm^3 ou mm^3 na câmara de Neubauer e não de espermatozoides por mL como no presente estudo.

Todo os parâmetros avaliados em sêmen fresco estão de acordo com o padrão da espécie (CBRA, 2013; SILVA et al., 2002).

A tabela 2, mostra as análises de motilidade e concentração 24h, 36h e 48h após o início do resfriamento, não houveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados, nos tempos analisados.

Tabela 2. Análises de motilidade e concentração 24h, 36h e 48h após o início do resfriamento do sêmen de cães raça Fila Brasileiro, diluído em BotuDogTurbo® e resfriado em caixas BotuFLEX®.

	24h		36h		48h	
	Mot. (%)	Vigor (1-5)	Mot. (%)	Vigor (1-5)	Mot.(%)	Vigor(1-5)
Cães < 1,5 anos	70,00 ± 20,00	3,00 ± 1,00	56,66 ± 15,27	2,66 ± 0,57	40,00 ± 20,00	1,66 ± 1,15
Cães ≥ 3,5 anos	56,66 ± 5,77	2,66 ± 0,57	53,33 ± 11,54	2,66 ± 0,57	36,66 ± 11,54	1,66 ± 0,57

Legenda: Mot. (motilidade).

A tabela 2 também mostra a queda de motilidade e vigor ao decorrer do tempo de resfriamento.

A queda de motilidade e vigor corrobora com o trabalho de ROCHA (2011), que avaliou sêmen de cães durante o resfriamento e observou queda de vigor e motilidade ao decorrer do tempo.

NASCIMENTO (2007) através do estudo do resfriamento de sêmen de cães da raça American Pit Bull Terrier com 2 diferentes diluidores, mostra que a motilidade do sêmen foi conservada em meio Tris até 30h de resfriamento e no meio UHT, até 24h do resfriamento. Após esses períodos de tempo, o sêmen tornou-se inviável para inseminação.

O sêmen canino fresco de qualidade aceitável deve apresentar $\geq 70\%$ de motilidade e o sêmen canino congelado de qualidade aceitável deve ter $\geq 50\%$ de motilidade (CBRA, 2013).

Considerando o parâmetro de motilidade do CBRA (2013) para sêmen fresco, no presente trabalho o sêmen viável para a inseminação foi de cães com menos de 1,5 anos até 24h de resfriamento. Considerando o padrão do CBRA (2013) para sêmen congelado,

os materiais genéticos de ambos os grupos ficaram viáveis até 24h de resfriamento, considerando o desvio padrão.

O CBRA (2013) não preconiza padrão de motilidade para sêmen canino resfriado, porém como demonstrado em vários trabalhos, o resfriamento do sêmen provoca queda de qualidade do material, deixando o questionamento do padrão de motilidade do sêmen resfriado de cães, não devendo ser comparado com sêmen fresco.

De acordo com a BOTUPHARMA (2022), a curva de resfriamento do sêmen na BotuFLEX® atinge 5°C após 4h de resfriamento e permanece até 46h, momento em que a temperatura começa a subir. Portanto, considerando o manual da BOTUPHARMA (2022), mesmo a temperatura não variando durante esse período, há queda na qualidade do sêmen.

O método utilizado para avaliar a motilidade é um método subjetivo. A avaliação subjetiva é usada tradicionalmente através da motilidade em massa e individual, porém existe uma variação de 30 a 60% na estimativa desse método devido a limitação humana em quantificar as subpopulações da amostra (AMANN e HAMMERSTEDT, 1980). Existe outro método de avaliação do mesmo parâmetro, o método *Computer Analysis System* (CASA).

O CASA é um método objetivo, computadorizado, de alta precisão e confiança, que analisa todos movimentos espermáticos individualmente e em massa, correlacionando com o potencial de fertilização do oócito. O programa pode gerar resultados mais fidedignos de motilidade que o método utilizado no estudo (COX et al., 2006).

TSUTSUI (2002), mostrou diferenças estatísticas significativas entre o sêmen de cães com diluidor de gema de ovo com Tris citrato de frutose e sêmen de cães com diluidor de gema de ovo com citrato-glicina-glicose, na queda de qualidade do sêmen resfriado a 4°C, durante 12 dias. O sêmen com diluidor de gema de ovo com citrato-glicina-glicose perdeu a qualidade mais rápido que o sêmen com o outro diluidor.

Os diluidores são essenciais para manter a viabilidade do sêmen quando resfriado, pois os espermatozoides perdem rapidamente sua capacidade de fertilização quando mantidos em plasma seminal. Existem diversas composições de diluidores para sêmen canino (ROMAGNOLI, 2002). O diluidor utilizado foi um diluidor comercial, portanto não se sabe a sua composição.

De acordo com ROMAGNOLI (2002), o sêmen diluído deve ter uma proporção de 1:3 ou de 1:5 de acordo com a sua composição. O presente trabalho utilizou a

proporção 1:1 e 2:1 descrita nas indicações de uso do diluidor comercial BotuDogTurbo®.

A morfologia do sêmen fresco está descrita na tabela 3, não houveram diferenças significativas entre os grupos. De acordo com o CBRA (2013), o sêmen deve ter no mínimo 70% de células normais, sendo, portanto, apenas 30% de defeitos totais. O sêmen fresco de ambos os grupos apresentou menos de 30% de defeitos totais.

Tabela 3. Morfologia do sêmen imediatamente após a coleta (fresco) de cães da raça Fila Brasileiro: defeitos totais, defeitos menores e defeitos maiores dos espermatozoides.

	Morfologia do sêmen fresco		
	Def. Totais (%)	Def. Maiores (%)	Def. Menores (%)
Cães < 1,5 anos	10,00 ± 1,73	7,66 ± 1,60	2,33 ± 0,28
Cães ≥ 3,5 anos	17,83 ± 6,44	18,83 ± 3,05	7,00 ± 3,90

Legenda: Def. Totais (defeitos totais); Def. Maiores (defeitos maiores); Def. Menores (defeitos menores).

A morfologia espermática é o estudo da anatomia do gameta masculino. A morfologia é um fator indispensável na avaliação andrológica pois está intimamente ligada a fertilidade dos cães. Alterações morfológicas estão correlacionadas com diminuição de motilidade e conseqüentemente incapacidade do espermatozoide em atingir o oócito, gerando infertilidade (OETTLÉ, 1993; KRUSTRITZ, 2010).

Levando em consideração todos os parâmetros avaliados para o sêmen fresco, todos os animais estão aptos a reprodução e o sêmen estava adequado para o resfriamento.

A tabela 4 mostra a morfologia do sêmen 24h após o resfriamento, não houveram diferenças significativas entre os dois grupos.

Os presentes resultados de defeitos totais de grupo de cães com 3,5 ou mais não corroboram com a CBRA (2013), pois há mais que 30%.

Tabela 4. Morfologia do sêmen diluído em BotuDogTurbo® de cães da raça Fila Brasileiro, 24h após o começo do resfriamento, em caixas de isopor BotuFLEX®: defeitos totais, defeitos menores e defeitos maiores dos espermatozoides.

	Morfologia do sêmen 24h		
	Def. Totais (%)	Def. Maiores (%)	Def. Menores (%)
Cães < 1,5 anos	25,50 ± 5,76	12,16 ± 5,83	13,33 ± 0,76
Cães ≥ 3,5 anos	30,50 ± 4,44	8,16 ± 5,50	22,33 ± 8,94

Legenda: Def. Totais (defeitos totais); Def. Maiores (defeitos maiores); Def. Menores (defeitos menores).

BLOM (1973) criou uma classificação dos defeitos dos espermatozoides, defeitos maiores e defeitos menores.

Os defeitos maiores são indicativos de prejuízo de fertilidade ou com condições de patologia de epidídimo e testículo, os defeitos menores são de menor importância e foram adquiridos por fatores extra testiculares (BLOM, 1973).

O aumento da temperatura testicular leve e por tempo curto pode justificar a presença de defeitos menores, a exposição prolongada a altas temperaturas outros tipos de defeitos aparecem (ROBERTS, 1986).

Ter mais defeitos maiores do que menores e grandes quantidades de defeitos totais pode ser indicativo de degeneração testicular e problemas endócrinos relacionados ao estresse (aumento de cortisol) (BARTH e BOWMAN, 1994.).

O estresse dos animais é um fator importante a ser avaliado durante a coleta do sêmen e manejo diário, pois pode aumentar os níveis de cortisol e interferir em motilidade, vigor, defeitos morfológicos maiores e defeitos morfológicos menores, como demonstra o trabalho de SOBRINHO (2009), com cães da raça rottweiler.

Não há no manual da CBRA (2013) a porcentagem máxima de defeitos maiores e menores para um reprodutor, porém sabe-se que a grande quantidade de defeitos maiores pode indicar prejuízos de fertilidade (BLOM, 1972).

Levando em consideração a maior proporção de defeitos menores do que maiores no grupo de cães ≥ 3,5 anos, pode-se concluir que as alterações foram extras testiculares e podem estar relacionadas a erros de esfregação e choque térmico.

Como mostra a tabela 5, não houveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos no parâmetro morfologia do sêmen, 36h após o começo do resfriamento. O percentual de defeitos totais foi menor que 30%, corroborando com a CBRA (2013).

Tabela 5. Morfologia do sêmen diluído em BotuDogTurbo® de cães da raça Fila Brasileiro, 36h após o começo do resfriamento, em caixas de isopor BotuFLEX®: defeitos totais, defeitos menores e defeitos maiores dos espermatozoides.

Morfologia do sêmen 36h			
	Def. Totais	Def. Maiores	Def. Menores
	(%)	(%)	(%)
Cães < 1,5			
anos	18,83 ± 10,27	8,50 ± 3,04	10,33 ± 7,52
Cães ≥ 3,5			
anos	17,50 ± 10,82	5,16 ± 3,32	12,33 ± 8,73

Legenda: Def. Totais (defeitos totais); Def. Maiores (defeitos maiores); Def. Menores (defeitos menores).

A tabela 6 mostra a morfologia do sêmen 48h após o começo do resfriamento, não houveram diferenças estatísticas significativas.

De acordo com NASCIMENTO (2007), na análise de morfologia do sêmen de cães, 12h, 18h 24h, 30h e 36h após o resfriamento, em nenhum desses períodos de tempo, os defeitos totais foram de mais de 30%. Os defeitos secundários estiveram em maior quantidade.

Tabela 6. Morfologia do sêmen diluído em BotuDogTurbo® de cães da raça Fila Brasileiro, 48h após o começo do resfriamento, em caixas de isopor BotuFLEX®: defeitos totais, defeitos menores e defeitos maiores dos espermatozoides.

Morfologia do sêmen 48h			
	Def. Totais	Def. Maiores	Def. Menores
Cães < 1,5			
anos	29,16 ± 17,67	13,16 ± 15,01	16,00 ± 2,78
Cães ≥ 3,5			
anos	20,50 ± 15,15	4,50 ± 2,64	16,00 ± 17,03

Legenda: Def. Totais (defeitos totais); Def. Maiores (defeitos maiores); Def. Menores (defeitos menores).

SILVA et al., (2009) destacou a diferença entre volume, vigor e concentração de sêmen de touros de diferentes idades após o congelamento.

A maturidade sexual dos reprodutores é o momento em que atinge o potencial satisfatório de fertilidade, um macho sexualmente maduro possui espermograma dentro do padrão, além de demonstrar interesse em monta natural. É avaliada principalmente através de exame de concentração e morfologia, sendo que animais muito jovens apresentam maiores quantidades de defeitos espermáticos que animais maduros sexualmente (BRITO et al, 2004).

Pouco se sabe sobre as diferenças morfológicas entre sêmen de cães de diferentes idades, mas sabe-se que na maioria dos cães em puberdade, os primeiros ejaculados vêm com uma grande quantidade de defeitos devido maturidade incompleta do sistema reprodutor e sistema endócrino (SILVA e LUZ, 2019). Não há nenhum estudo comparando análises espermáticas entre grupos de cães Fila Brasileiro de diferentes idades.

No presente estudo, todos os parâmetros avaliados de cães com menos 1,5 anos de idade, considerados jovens, não mostraram diferenças significativas de cães mais velhos.

Os cães da raça Pastor Alemão têm “permissão” para o acasalamento a partir de 18 meses, sendo os únicos cães do Brasil. Para os outros cães não há regulamentação de idade mínima para seu uso na reprodução. A idade de puberdade dos cães depende das características genéticas, nutricionais e menos relevante, ambientais. Cães padreadores devem ter nutrição diferenciada e desde os quatro meses estar na presença de uma cadela no cio para o estímulo sexual (SILVA e LUZ, 2019).

O uso de medicações como glicocorticoides, antifúngicos e exames esteroides provocam defeitos deletérios na formação de espermatozoides (SILVA e LUZ, 2019).

As características seminais normais de um cão podem variar com a raça, idade, porte, atividade sexual, tamanho testicular (CBRA, 2013), sendo os padrões de características seminais para raças inexistentes.

Doenças e patologias do sistema reprodutor podem interferir na reprodução dos cães podendo levar o animal a oligosperma, teratozoospermia e azoospermia, por isso é de extrema importância o exame físico de todo animal. Algumas causadas de alterações seminais são, as neoplasias testiculares, orquite/epididimite, Leishmaniose Visceral Canina, Brucelose, torção testicular, entre outras (SILVA e LUZ, 2019).

Outros parâmetros podem ser utilizados para trazer resultados mais fidedignos do potencial reprodutivo do sêmen dos cães analisados, como ultrassonografia testicular e prostática, aferição do diâmetro testicular, teste de integridade de membrana plasmática, integridade de acrossomo e dosagens hormonais (CBRA, 2013).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sêmen fresco dos cães Fila Brasileiro estava dentro dos padrões da espécie de acordo com a CBRA (2013), quanto aos parâmetros motilidade, vigor, concentração e morfologia dos espermatozoides.

Através do exame andrológico foi possível concluir que todos os animais eram aptos a reprodução.

Não houveram diferenças estatísticas significativas nos parâmetros motilidade, concentração, volume e morfologia do sêmen entre os grupos de cães com menos de 1,5 anos e cães com 3,5 anos ou mais, em todos os tempos. Houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos no parâmetro vigor do sêmen fresco, porém os resultados estavam dentro do padrão da espécie de acordo com a CBRA (2013).

Houve maior quantidade de defeitos menores do que maiores na morfologia de cães com 3,5 anos ou mais, após 24h do início do resfriamento, tornando a quantidade defeitos totais alta para a espécie. Fatores que podem ser explicados por erros na execução do esfregaço ou choque térmico das células espermáticas.

8. CONCLUSÃO

O sêmen de ambos os grupos perdeu a qualidade durante o decorrer do resfriamento e o método de resfriamento em caixa de isopor BotuFLEX® mostrou-se eficiente em até 24h após o resfriamento.

São necessários mais estudos sobre o resfriamento e andrologia de cães Fila Brasileiro para padronizar as características andrológicas da raça e para ter conhecimento sobre o tempo máximo que o sêmen pode ser conservado por esse método, sem que perca a viabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; SHARMA, R.K.; NELSON, D.R.N. New sêmen quality scores developed by principal component analysis of sêmen characteristics. **J. Androl.**, v. 24, 2003.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biol. Reprod.**, v.23, p.6478-645, 1980.

BANE, A. Sexual funtion of bulls in relation to heredity rearing in tensity and somatic conditions. **Acta Agrix. Scand.**, 97:4-95, 1954.

BARTH, A.D; BOWMAN, P.A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Can. Vet. J.**, v.35, p.93-102, 1994.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Vet. Med.**, v.25, p.383-391, 1973.

BOTUPHARMA. BotuFlex: Transporte de sêmen refrigerado. Brasil. Disponível em: <https://botupharma.com/produto/botuflex/>. Acesso em: 06 jun. 2022.

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.

BRITO, L.F.C, et al. Sexual development in earlyand late-maturing Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v.62, p.1198-1217, 2004.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Determinação da concentração espermática no sêmen de cães Pastores Alemães através da espectrofotometria. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, p.384-386, 2003.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Anim. Reprod.**, v.2, p.257-262, 2005.

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**, v.59, p.743-751, 2003.

CHENOWETH, P.J. Libido and mating ability in bulis. In: MARROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia, W.B. Saunders., p.342-4., 1980.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 3ª ed. 2013, 104p.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p. 860-867, 2006.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fertil.**, v.47, p.243 -255, 1993.

ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooledrewarmed dog semen. **Theriogenology**, v.46, p.165- 171, 1996.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.42, p.251-260, 1996.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 3º ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004, p.930-1010.

FCI. Padrão Oficial da Raça Fila Brasileiro. Brasil, set. de 2016. Disponível em: https://cbkc.org/application/views/docs/padroes/padrao-raca_46.pdf. Acesso em: mar. 2022.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7 ed. - Barueri, SP: Manole, 2004, 501p.

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.

JOHNSON, C. Conceitos atuais sobre infertilidade no cão. **Waltham Focus**. v.16, p.7-12, 2006.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001, 592p.

KLEIN, G.B. CUNNINGHAM: **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 5ª ed., 2014, 1135p.

KRUSTRITZ, M.V. **Clinical canine and feline reproduction: Evidence based answers**. 1º ed. Iowa: editora Offece, 2010, p.25-27; 29-33.

LUZ, M.R; SILVA, A.R. **Reprodução de cães**. 1 ed. Barueri: Manole, 2019, p.53-70.

MARITI, C., et al. Dog attachment to man: a comparison between pet and working dogs. **Journal of Veterinary Behavior**, 2012.

MARTINEZ, A.L.P. Canine fresh and cryopreserved sêmen evaluation. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82, p.209-24, 2004.

MCPHAIL, D.B.; GOODMAN, B.A. **Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems**. *Bioch. J.*, v.221, 1984, p.559-560.

MEMON, M.A. Common causes of male dog infertility. **Theriogenology**, v.68, p.322-328, 2007.

MEYERS-WALLEN, V.N. **Análise do sêmen, inseminação artificial, e infertilidade no cão macho**. In: Ettinger. Tratado de medicina interna veterinária. 1º edição: Manole, v.2, 1997, p.2275-2293.

NASCIMETO, M.V. et al. Acondicionamento de sêmen canino para transporte utilizando diferentes diluentes. **Ciêc. Anim.**, p. 37-44, 2007.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 5º edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015, p. 905-907.

NOGUEIRA, G.P.O.S. **Biometria testicular e comportamento sexual em cães da raça Australian Cattle Dog**. 2018. 28f. Monografia. UFU – Faculdade de Medicina Veterinária, Uberlândia, 2018.

OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.257-260, 1993.

OSBORNE, H.G.; WILLEANS, L.G.; GALLOWAY, D.B. A test for libido and serving ability in beef bulls. **Aust. Vet. J.**, p.47, 1971.

PEÑA, A.I. **Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion descongelação**. 1997. 329f. Tese (Doutorado) - Universidad de Santiago de Compostela. Lugo, Espanha, 1997.

ROBERTS, S.J. **Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology)**. New York: Cornell University, 3 ed., 1986, 1060p.

ROCHA, A.A. **Fertilidade in vitro e in vivo do sêmen canino refrigerado**. 2011. 81f. Tese (Doutorado) - UENFDR. Faculdade de Medicina Veterinária, Goytacazes, 2011.

- RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado.** 1997. 176f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 1997.
- ROMAGNOLI, S. Canine artificial insemination with fresh, refrigerated and frozen sêmen. In: Congresso de Ciências Veterinárias. **Animiais de companhia.** Oeiras, 2002, p. 167-170, 2002.
- ROMAGNOLI, S.; SCHLAFER, D.H. Disorders of sexual differentiation in puppies and kittens: diagnostic and clinical approach. **Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.**, v.36, p.573-606, 2006.
- SANTOS, I.W. **Albumina sérica bovina como fonte proteica do diluidor Tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino.** 2004. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2004.
- SANTOS, J.F.P. et al. Andrologia e criopreservação de sêmen em cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.4, p.167-179, 2016.
- SILVA, A.R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.119-127, 2007.
- SILVA, A.R. Avaliação andrológica de cães e gatos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.5, p.52-55, 2002.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine sêmen freezing. **The Vet. J.**, v.164, p.244-246, 2002.
- SILVA, A.R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos.** 2005. 165f.

Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - UEC. Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2005.

SILVA, A.R. et al. Efeito da idade do touro e do período de colheita do sêmen sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de bovinos de raças européia e zebuínas: Melhoramento, Genética e Reprodução. P.3, **R. Bras. Zootec.**, 2009.

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

SILVA, A.S.F. **Caracterização genética, andrológica e congelabilidade do sêmen em cães da raça Fila Brasileiro**. 2021, 84f. Tese (Doutorado) – UFMG. Faculdade de Medicina Veterinária, Belo Horizonte, 2012a.

SILVA, H.V.R. et al. Adição do BHT ao diluidor ACP-106c para a criopreservação do sêmen canino. **Ciênc. Anim. Suplemento**, p.513-515, 2012b.

SOBRINHO, B.C.A. et al. Efeitos do estresse de trabalho sobre parâmetros seminais de cães da raça Rottweiler. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 280-287, 2009.

SOUZA, F.F. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. 2003. 98p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

TSUTSUI. et al. Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. *Journal of Veterinary. Med. Sci.*, v.65, p.307-312, 2003.

VALLE, D.P.; MONTE, E. **O Grande Livro do Fila Brasileiro: Quatro séculos da história do Brasil**. 1 ed. Brasil: Wallace Editora e Representações LTDA, 1981, 388p.

YAMAMOTO M.E.; VALENTOVA, J. V.; LEITÃO, M. B. P. HATTORI W. T. **Manual de Psicologia Evolucionista**. Natal: EdufRN, 2018, 844 p.