

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**

**Janaina de Fátima Saraiva Cardoso**

**USO DO DILUIDOR À BASE DE ÁGUA DE COCO NA FORMA DE PÓ  
(ACP-106<sup>®</sup>) PARA O RESFRIAMENTO A 4 °C DO SÊMEN CANINO**

**Fortaleza - Ceará**

**Julho, 2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**

**Janaina de Fátima Saraiva Cardoso**

**USO DO DILUIDOR À BASE DE ÁGUA DE COCO NA FORMA DE PÓ  
(ACP-106<sup>®</sup>) PARA O RESFRIAMENTO A 4 °C DO SÊMEN CANINO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.**

**Área: Reprodução e Sanidade Animal**

**Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva.**

**Fortaleza – Ceará**

**Julho, 2006**

C268u Cardoso, Janaina de Fátima Saraiva

Uso do diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106<sup>®</sup>) para o resfriamento a 4 °C do sêmen canino./ Janaina de Fátima Saraiva Cardoso. – 2006  
68 p.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Resfriamento 2. Água de coco 3. Cão I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.0826

**JANAINA DE FÁTIMA SARAIVA CARDOSO**

**USO DO DILUIDOR À BASE DE ÁGUA DE COCO NA FORMA DE PÓ (ACP-106®)  
PARA O RESFRIAMENTO A 4 °C DO SÊMEN CANINO**

Aprovada em: 28/07/2006

Conceito obtido: Satisfatório

Nota obtida: 9,7

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva

**Presidente da Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo

**Membro da Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira

**Membro da Banca Examinadora**

---

Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro

**Membro suplente da Banca Examinadora**

A **Deus**, por alcançar mais esta vitória, por me consolar nas horas de desespero ou aflição.

À minha família pelo incentivo, paciência, amor, dedicação.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

---

---

A Deus por me oferecer paciência, fé e por ter sido minha fortaleza. Obrigado meu grandioso Deus...

À minha querida família por todo apoio compreensão e paciência.

Ao meu querido marido Ney Rômulo de Oliveira Paula pelo amor, apoio incondicional e por todo o esforço, sem o qual este trabalho não teria sido realizado em tempo hábil.

À minha orientadora Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva pelo enriquecimento profissional e pessoal, e também por todas as ajudas prestadas, pela compreensão, pela confiança em desenvolver um projeto e por todas as sugestões dadas durante esse período de aprendizagem.

À Ticiania Franco Pereira da Silva, Daniel Couto Uchoa, Rita de Cássia Soares Cardoso, Alexandre Rodrigues Silva pela amizade, inestimável apoio durante os experimentos, momentos de dificuldades e pela contribuição para meu crescimento profissional.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Kelen Felipe Lima, Carlos Gabriel de Alemida Dias pelos momentos de descontração e amizade, Victor Leão Hitzschiky Madeira, Raimundo Diones Carneiro, Camila Louise Ackermann, Henna Roberta Quinto e Daniel Falcão Menezes Brilhante, por me ajudarem a crescer profissionalmente de uma forma ou de outra.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo, pela orientação, atenção e pela ajuda oferecida em momentos difíceis no decorrer do experimento.

Ao Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira, pela grande amizade e incentivo principalmente nesta fase final do curso.

À ACP Biotecnologia na pessoa da Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro e do Dr. João Monteiro Gondim (*in memoriam*) pelo fornecimento do diluidor ACP-106<sup>®</sup>, objeto de estudo desta dissertação, pela atenção e por estarem sempre à disposição nos momentos de dúvidas e dificuldades.

À CAPES pelo apoio financeiro na forma de bolsa durante todo o mestrado, o que contribuiu de forma significativa para meu aproveitamento no curso e pesquisas realizadas.

A todos os funcionários do PPGCV por toda a ajuda prestada durante este e outros períodos.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4, 3

## RESUMO

---

Foram utilizados 20 ejaculados caninos em dois experimentos. O sêmen foi diluído em ACP-106<sup>®</sup> e resfriado a 4 °C. Foi avaliado o pH, motilidade, vigor, morfologia espermática e acrossomal e teste hiposmótico durante o período de armazenamento. Este trabalho foi dividido em duas etapas: na primeira, foram avaliadas as concentrações de 0, 5, 10 e 20 % de gema de ovo e, na segunda etapa, foi testada a adição de dodecil sulfato de sódio (DSS) ao diluidor ACP-106<sup>®</sup>. Para a análise estatística, foi empregada a transformação angular para os dados em percentual, seguida do Teste t de Student. O vigor foi avaliado pelo teste de Mann-Whitney. No experimento 1, após um dia de resfriamento, a inclusão de 20% de gema de ovo, possibilitou uma melhor conservação da motilidade quando comparada aos grupos 5% ou 0% e o grupo 10% foi semelhante aos demais. Do quarto ao sexto dia, houve uma melhor conservação da motilidade e vigor no grupo 0% em relação ao 5%. Os grupos 10% e 20% não diferiram dos demais. Após sete dias de resfriamento, o grupo 0% apresentou motilidade e vigor superiores aos grupos 5% e 10%. O grupo 20% não diferiu dos demais grupos. No dia quatro, o grupo 0% melhor protegeu a integridade funcional de membrana apenas em relação ao diluidor com 5% de gema de ovo. Após um dia de resfriamento, os grupos 10 e 20% possibilitaram uma melhor conservação da morfologia acrossomal, em comparação ao grupo 0%. No experimento 2, após a diluição foi observada ausência de motilidade e vigor nas alíquotas diluídas em ACP-106<sup>®</sup> contendo DSS sem gema. Nos dias um a três, a motilidade e o vigor foram significativamente inferiores nas alíquotas diluídas em ACP-106<sup>®</sup> em comparação com a adição de gema de ovo contendo ou não DSS. Nos dias quatro e cinco, a diluição em ACP-106<sup>®</sup> com gema de ovo, possibilitou uma melhor conservação da motilidade e vigor quando comparada ao grupo sem aditivos e o grupo contendo gema e DSS foi semelhante aos demais. Durante todo o período de resfriamento, a adição de gema de ovo resultou em motilidade estatisticamente semelhante à adição de gema e DSS. A morfologia foi significativamente afetada pela diluição em ACP-106<sup>®</sup> associado ao DSS. No dia três, a adição de gema e DSS promoveu uma proteção da morfologia significativamente superior aos demais grupos. No dia quatro, o grupo contendo gema e DSS foi superior apenas ao grupo sem aditivos. Após um dia de resfriamento, a diluição em ACP-106<sup>®</sup> sem aditivos resultou em percentual inferior de membranas funcionais quando comparado com os demais grupos. Nos demais dias, o grupo com gema de ovo possibilitou melhor proteção em relação a ausência de aditivos. Diante dos resultados, conclui-se que o sêmen canino diluído em ACP-106<sup>®</sup> e resfriado a 4 °C pode ser eficientemente conservado por até três dias, que a exclusão da gema de ovo reduz a qualidade do sêmen canino resfriado e que a inclusão de DSS ao ACP-106<sup>®</sup> contendo gema de ovo não melhora a qualidade do sêmen e apresenta efeito deletério na ausência de gema.

## LISTA DE FIGURAS

---

---

	Pág.
FIGURA 1. Desenho experimental adotado para a execução do trabalho de mestrado, utilizando-se 20 ejaculados caninos .....	15
FIGURA 2. Processamento do sêmen adotado para a execução do trabalho de mestrado nos experimentos 1 e 2.....	17
FIGURA 3. Porcentagem de espermatozóides caninos morfologicamente normais após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106 <sup>®</sup> adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio (DSS).....	28
FIGURA 4. Porcentagem de espermatozóides caninos apresentando membranas funcionais após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106 <sup>®</sup> adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio (DSS).....	29

## LISTA DE TABELAS

---

		Pág.
TABELA 1.	Características (média $\pm$ dp) dos ejaculados frescos dos animais no experimento 1 .....	20
TABELA 2.	Motilidade do sêmen canino após a diluição (dil) em ACP-106 <sup>®</sup> contendo diferentes concentrações de gema de ovo e resfriamento a 4 °C.....	21
TABELA 3.	Porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais (média $\pm$ dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP-106 <sup>®</sup> contendo diferentes concentrações de gema de ovo .....	22
TABELA 4.	Vigor do sêmen canino após a diluição (dil) em ACP-106 <sup>®</sup> contendo diferentes concentrações de gema de ovo e resfriamento a 4 °C.....	23
TABELA 5.	Valores de pH (média $\pm$ dp) do sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP-106 <sup>®</sup> contendo diferentes concentrações de gema de ovo .....	24
TABELA 6.	Porcentagem de espermatozóides apresentando membranas funcionais (média $\pm$ dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP-106 <sup>®</sup> contendo diferentes concentrações de gema de ovo .....	24
TABELA 7.	Porcentagem de espermatozóides apresentando acrossomas morfolologicamente normais (média $\pm$ dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP-106 <sup>®</sup> contendo diferentes concentrações de gema de ovo .....	25
TABELA 8.	Características (média $\pm$ dp) dos ejaculados frescos dos animais no experimento 2 .....	25
TABELA 9.	Motilidade dos espermatozóides caninos após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106 <sup>®</sup> adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio.....	26
TABELA 10.	Vigor dos espermatozóides caninos após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106 <sup>®</sup> adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio (DSS) .....	27

TABELA 11. Valores de pH (média $\pm$ dp) do sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106 <sup>®</sup> adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio (DSS) .....	27
TABELA 12. Porcentagem de espermatozóides apresentando acrossomas morfolologicamente normais (média $\pm$ dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106 <sup>®</sup> adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio (DSS) .....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
%	Porcentagem
°C	Graus celsius
µL	microlitros
ACP <sup>?</sup>	Água de coco na forma de pó
ACP-106 <sup>®</sup>	Diluidor para sêmen de carnívoros à base de água de coco na forma de pó
CAPES	Comissão de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
DSS	Dodecil sulfato de sódio
FAVET	Faculdade de Veterinária
Fig.	Figura
IA	Inseminação Artificial
L	Litro
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
min	Minutos
mL	Mililitros
mOsm	Miliosmol
n	Número
pH	Potencial hidrogeniônico
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
SAS	Statistical Analysis System
Tab.	Tabela
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
v/v	Volume:Volume

## SUMÁRIO

---

	Pág.
1) INTRODUÇÃO.....	01
2) REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1) O sêmen e os espermatozóides .....	02
2.2) Resfriamento do sêmen .....	03
2.3) Os diluidores do sêmen .....	04
2.3.1) A água de coco .....	05
2.4) Uso de antibióticos nos diluidores de sêmen .....	07
2.5) Protetores de resfriamento .....	08
3) JUSTIFICATIVA .....	11
4) HIPÓTESES CIENTÍFICAS .....	13
5) OBJETIVOS.....	14
6) MATERIAL E MÉTODOS .....	15
6.1) Desenho Experimental .....	15
6.2) Animais Experimentais .....	16
6.3) Preparação dos diluidores .....	16
6.4) Coleta e processamento do sêmen .....	16
6.5) Avaliação do sêmen .....	17
6.6) Análise Estatística .....	18
7) RESULTADOS.....	20
7.1) Experimento 1 .....	20
7.2) Experimento 2 .....	25
8) DISCUSSÃO .....	31
8.1) Experimento 1 .....	31
8.2) Experimento 2 .....	33
9) CONCLUSÕES .....	36
10) PERSPECTIVA .....	37
11) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
12) ANEXOS .....	45

# 1. INTRODUÇÃO

---

O resfriamento do sêmen consiste na preservação dos gametas sem atingir o ponto de congelamento. Quando comparado com o resfriamento, a criopreservação do sêmen canino requer técnica e equipamentos mais sofisticados, com taxas de gestação geralmente inferiores. Além disso, o embarque do sêmen resfriado apresenta menor custo e o regulamento para importar e exportar é mais simples do que o do sêmen congelado. Deste modo, o resfriamento apresenta-se como uma alternativa promissora, principalmente por ser facilmente adaptado para o uso clínico (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

O processo de conservação ocasiona danos espermáticos, tais como: redução da motilidade e do vigor, aumento no percentual de alterações morfológicas, entre outros que implicam na redução da qualidade do sêmen preservado. A fim de minimizar esses danos, foram identificadas substâncias de vital importância na tecnologia do sêmen designados de diluidores (RODRIGUES, 1997).

Diversos diluidores foram utilizados para o resfriamento do sêmen canino como: Fresh-phos, Biladyl, EDTA, Tris-frutose, Tris-glicose, Tris-BES, leite desnatado, plasma seminal autólogo e o diluidor à base de água de coco. Dentre estes, o diluidor à base de água de coco destaca-se por sua comprovada eficácia para a conservação do sêmen canino e por ser um produto genuinamente brasileiro.

A água de coco possui características que a classifica como um bom diluidor. O diluidor à base de água de coco foi desenvolvido inicialmente para utilização no sêmen caprino, mas já foi utilizado com bastante sucesso para a diluição do sêmen de várias espécies. Com relação ao sêmen canino, foram realizados trabalhos *in vitro* (CARDOSO et al., 2000) e *in vivo* (PEREIRA et al., 2001) obtendo-se bons resultados. Recentemente foi desenvolvido um diluidor à base de água de coco na forma de pó, sendo então denominado ACP-106<sup>®</sup> o diluidor para uso no sêmen canino (MADEIRA et al., 2004). No entanto, ainda observa-se um pequeno número de trabalhos avaliando-se o sêmen canino diluído e resfriado, especialmente em ACP-106<sup>®</sup>, bem como o efeito de aditivos e o percentual de inclusão de gema de ovo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 1. O sêmen e os espermatozóides

Os espermatozóides são células equipadas com um forte flagelo que os impulsionam através de um meio aquoso, não apresentam organelas citoplasmáticas, tais como ribossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, os quais são desnecessárias para a transferência do seu material genético ao oócito. Por outro lado, os espermatozóides possuem várias mitocôndrias a fim de proporcionar energia ao flagelo de modo eficiente (ALBERTS et al., 1997).

São formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos, são células alongadas, consistindo de uma cabeça achatada contendo um núcleo e de uma cauda. É todo recoberto pelo plasmalema ou membrana plasmática. O acrossoma é uma estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo que contém várias enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fertilização, incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas. O colo conecta a cabeça do espermatozóide à cauda, que é subdividida em peça intermediária, principal e terminal (HAFEZ, 1995).

O sêmen é uma suspensão celular semi-gelatinosa, contendo gametas masculinos, isto é, os espermatozóides, e as secreções oriundas dos órgãos acessórios do trato reprodutivo masculino (HAFEZ, 1995). A porção fluida desta suspensão que é formada na ejaculação é conhecida como plasma seminal, cuja origem é principalmente a próstata, única glândula acessória no cão. O ejaculado canino consiste em três frações distintas, sendo a primeira e a terceira de origem prostática; a segunda, denominada fração espermática, é de origem testicular e rica em espermatozóides (CHRISTHIANSEN, 1988).

O ejaculado não é uma solução estéril, devido à presença da flora bacteriana normal do pênis e mucosa prepucial e na uretra distal. Os microorganismos comumente isolados do sêmen são os mesmos que estão presentes na microflora uretral normal, e incluem *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus sp.*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium sp.*, *Moraxella sp.*, *Pseudomonas sp.*, e *Mycoplasma sp.* O resultado do cultivo aeróbio do sêmen somente é sugestivo de infecção do trato reprodutivo se apresentar valores superiores a 10.000 unidades formadoras de colônia por mililitro de sêmen canino (JOHNSTON et al., 2001).

## 2. Resfriamento do sêmen

O resfriamento consiste na preservação dos gametas sem atingir o ponto de congelamento que induz a mudanças intracelulares deletérias que afetam a viabilidade e o potencial fertilizante do espermatozóide (IGUER-OUADA, 2001).

O sêmen diluído e resfriado foi utilizado com sucesso para o cão pela primeira vez em 1954 por Harrop (BOUCHARD et al., 1990), mas somente nos últimos anos, a utilização do sêmen resfriado para inseminação artificial em cães tem tornado-se mais popular (ROTA et al., 1995).

Em diversas espécies, têm sido obtidas gestações, utilizando-se a inseminação artificial com uso de sêmen resfriado por curto período. A manutenção da atividade fertilizante do espermatozóide pela diluição e resfriamento de sêmen deve-se principalmente a três fatores: a) baixo metabolismo espermático em baixas temperaturas; b) proteção contra o choque térmico pelo diluidor; c) resistência inerente do espermatozóide canino a esse choque térmico (BOUCHARD et al., 1990).

Alterações irreversíveis na membrana espermática, isto é, distúrbios na estrutura de bi-camada proteíno-lipídica, como um decréscimo na fluidez e aumento na permeabilidade da membrana, danos acrossômicos, desidratação, liberação de enzimas e fosfolipídios, redução da atividade metabólica e diminuição no consumo de ATP são conseqüências do resfriamento e congelação, as quais podem, parcial ou totalmente comprometer a fertilidade. O resultado mais evidente dessas mudanças é a queda na motilidade espermática (FARSTAD, 1996).

A etiologia do choque térmico envolve o dano à membrana celular e alterações na função metabólica, provavelmente pela mudanças no arranjo dos constituintes de membrana (MEDEIROS et al., 2002), perda da permeabilidade seletiva da membrana e ruptura das membranas acrossomais (MEDEIROS et al., 2002). Um decréscimo da temperatura causa uma transição de fase nos fosfolipídios da membrana da fase líquida-cristalina para a fase de gel, resultando numa estrutura mais rígida, a qual tem conseqüências deletérias substanciais (MEDEIROS et al., 2002; ABOAGLA & TERADA, 2004). A temperatura é específica para a transição de fase de fosfolipídios na membrana, resultando na migração lateral com rearranjo dos componentes da membrana e separação da fase de lipídio na membrana. A migração lateral pode criar microdomínios de lipídios não pertencentes à bicamada e pode modificar ambientes proteicos circunvizinhos (MEDEIROS et al., 2002).

Temperaturas de 35, 22, 5 e 4 °C já foram testadas as para a conservação do sêmen canino, tendo-se observado melhor resultado com a utilização da temperatura 4 °C

(BOUCHARD et al., 1990). A habilidade espermática em resistir à queda de temperatura difere entre as espécies. Os espermatozoides eqüino, felino, canino e humano são relativamente insensíveis ao choque térmico, enquanto que os do caprino, bovino e ovino têm média sensibilidade, e os do suíno são extremamente sensíveis (WATSON & PLUMMER, 1985; BWANGA, 1991). Deste modo, o uso de taxas de resfriamento de moderadas a rápidas resultam em maiores porcentagens de espermatozoides móveis e progressivos, refletindo a resistência inerente ao choque térmico do espermatozoide canino (BOUCHARD et al., 1990).

Com o aumento no período de armazenamento, ocorre um decréscimo na motilidade do sêmen resfriado, esse fenômeno tem sido atribuído à sensibilidade térmica da bomba sódio-potássio-ATPase e subsequente dispersão de íons (PONGLOWHAPAN et al., 2004). O sêmen diluído em Tris contendo 20 % de gema de ovo pode ser estocado a 4 °C por quatro dias segundo Rota e colaboradores (1995) ou até doze dias segundo Ponglowhapan e colaboradores (2004). Apesar disso, essa técnica tem se tornado recentemente popular desde que seja possível transportar as amostras rapidamente entre os locais de coleta e inseminação artificial. Sabe-se que após certo tempo, a qualidade do sêmen resfriado não difere da do sêmen congelado/descongelado e que, após um maior tempo, a qualidade do sêmen resfriado é ainda menor que a do sêmen congelado/descongelado (ENGLAND & PONZIO, 1996). O sêmen resfriado/aquecido parece ser menos prejudicado no processo de preservação. Após a inseminação artificial, a taxa de gestação aparenta ser mais alta que aquela atingida pelo sêmen congelado/descongelado (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1993).

### **3. Os diluidores do sêmen**

Diversos diluidores foram utilizados para o resfriamento do sêmen canino como: Fresh-phos, Biladyl, EDTA, Tris-frutose, Tris-glicose, Tris-BES (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001), leite desnatado, plasma seminal autólogo (ROTA et al., 1995) e, recentemente, o diluidor à base de água de coco (FONTENELE et al., 2002).

Um bom diluidor deve conter nutrientes com uma reserva de energia, servir como tampão ajustando as alterações no pH, promover uma pressão osmótica e concentração de íons dentro dos padrões fisiológicos, prevenir o crescimento de bactérias, proteger as células do choque térmico durante o processo de resfriamento e possuir crioprotetores que reduzam os danos às células espermáticas durante a congelação e posterior descongelação (CONCANNON & BATISTA, 1989).

Os ingredientes que compõem os diluidores do sêmen são semelhantes aos da maioria dos meios de cultivo de células, os quais contêm substrato energético, tampão biológico, diversos eletrólitos e um importante componente são os antibióticos, utilizados para prevenir o crescimento bacteriano (ALTHOUSE et al., 2000).

### 3.1. A água de coco

A água proveniente do fruto *Cocos nucifera* é uma solução estéril, ligeiramente ácida, contendo proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento (fitormônios) e poucos fosfolipídios (NUNES, 1995).

A água de coco *in natura* proveniente de frutos com idade de seis meses (variedade verde da praia) apresenta uma osmolaridade em torno de 500 mOsmol/L e um pH de 4,5 a 5,0 (NUNES & COMBARNOUS, 1995). Para uma perfeita compatibilização da água de coco com o sêmen canino, deve ser feita uma correção da osmolaridade para 300-310 mOsmol/L e do pH para 6,2 a 6,6 (SILVA, 1999). Como correção inicial, após filtrar a água de coco, adiciona-se água destilada e uma solução de citrato de sódio a 5 % (NUNES, 1995). Desse modo, o diluidor à base de água de coco é composto por cerca de 50 % de água de coco *in natura* + 25% de água destilada + 25 % de citrato de sódio a 5 % (FONTENELE et al., 2002).

Apesar da comprovada eficácia da solução à base de água de coco para a diluição do sêmen de diversas espécies, como caprinos (NUNES, 1995), suínos (TONIOLLI & MESQUITA, 1990), capotes (MILITÃO et al., 1994), ovinos (SOUZA et al., 1994) e caninos (CARDOSO et al., 2000), verifica-se a existência de poucos trabalhos avaliando-se sua eficiência para a conservação sêmen canino pelo resfriamento (FONTENELE et al., 2002; CARNEIRO et al., 2005). Contudo, estes trabalhos revelaram um resultado ainda insatisfatório para a utilização do sêmen canino resfriando com diluidores à base de água de coco em nível comercial.

Entretanto, a utilização da água de coco como diluidor de sêmen se depara com algumas dificuldades de ordem prática como a disponibilidade de frutos com características ideais, ou seja, com cerca de seis meses de maturação, e a impossibilidade de armazenamento do produto. Desse modo, um processo que possibilitasse a sua conservação numa forma em que suas características benéficas não fossem alteradas e permitisse o rápido preparo do diluidor, facilitaria o seu uso, inclusive em regiões que não dispõem do fruto (BRAZ et al., 2003).

Com o intuito de permitir a difusão da tecnologia em locais que não possuem o fruto e simplificar seu uso, a água de coco foi padronizada na forma de pó através de um processo de vaporização em “Spray Dryer” no aparelho de modelo AS0340D, fabricado por Niro Atomizer Mobile Minor (SALGUEIRO et al., 2002; SAMPAIO NETO et al., 2002). A solução à base de água de coco produzida na forma de pó foi denominada ACP<sup>®</sup>, sendo então denominado ACP-106<sup>®</sup> o diluidor para uso no sêmen canino.

Estudos anteriores revelaram que o diluidor ACP-106<sup>®</sup> pode ser utilizado com a mesma eficiência que o diluidor a base de água de coco *in natura* para a criopreservação do sêmen canino (CARDOSO, 2005) e para diluição do sêmen fresco utilizado para inseminação artificial (UCHOA, 2004).

A qualidade do sêmen canino após a descongelação, utilizando o diluidor ACP-106<sup>®</sup>, foi mais bem estudada em comparação à qualidade do sêmen resfriado. Cardoso (2005) demonstrou que o sêmen canino pode ser criopreservado utilizando uma taxa de diluição fixa (1:1) ou a concentração espermática de 200 milhões de espermatozóides por mL e que o armazenamento a -10 °C não diminuiu a eficiência do diluidor ACP-106<sup>®</sup> para a criopreservação do sêmen canino, constituindo uma alternativa de estocagem do diluidor e aumento de sua vida útil. Em relação à qualidade do sêmen canino após a descongelação, foi observada uma motilidade média de 52% quando avaliada subjetivamente, contudo, este parâmetro foi significativamente superior ao estimado pela análise computadorizada da motilidade que revelou um valor 23% (CARDOSO, 2005). Essa divergência na motilidade foi atribuída à incompleta dissolução da gema de ovo no diluidor ACP-106<sup>®</sup>, o que gerou a presença de partículas que foram identificadas pelo equipamento de análise computadorizada como espermatozóides imóveis. Outro parâmetro avaliado por Cardoso (2005) foi a integridade de membrana após a descongelação, onde foi encontrado um percentual de apenas 35,1% de espermatozóides com membranas intactas. No entanto, no ensaio de interação com zona pelúcida, foi observada uma média de 75,3% de espermatozóides interagidos com oócitos homólogos.

Em relação ao sêmen canino resfriado, Madeira e colaboradores (2004) observaram que o diluidor ACP-106<sup>®</sup> contendo 20% de gema de ovo conservou melhor a qualidade do sêmen canino resfriado a 4 °C por até 96 horas quando comparado ao líquido prostático autólogo ou o diluidor ACP-106<sup>®</sup> sem gema de ovo. Já Carneiro e colaboradores (2005), observaram que os diluidores Tris, ACP-106<sup>®</sup> e o diluidor à base de água de coco *in natura*, conservaram de maneira semelhante à qualidade do sêmen canino a 5 °C. No entanto, neste

último trabalho, a motilidade do sêmen resfriado em ACP-106<sup>®</sup> sofreu uma redução drástica de 86,66% no sêmen fresco para 51,66% após 24 horas de resfriamento.

A utilização do ACP-106<sup>®</sup> para diluição do sêmen fresco para inseminação artificial, possibilitou a obtenção de taxas de parição e índice de prolificidade semelhantes à monta natural, além de favorecer o nascimento de um maior número de fêmeas em relação a machos por ninhada (UCHOA, 2004). Segundo Uchoa (2004), o índice de prolificidade e a taxa de parição das cadelas inseminadas com sêmen diluído em ACP-106<sup>®</sup> foi de 7,12 e 91%, respectivamente. Uchoa (2004) observou que a proporção de machos:fêmeas nos filhotes nascidos após monta natural girava em torno de 50%. No entanto, após inseminação artificial com sêmen fresco em diluidor à base de água de coco *in natura*, essa proporção passou para 33,7% de machos e 66,3% de fêmeas e após inseminação artificial com sêmen fresco diluído em ACP-106<sup>®</sup>, nasceram 35,7% de machos em detrimento de 64,3% de fêmeas.

#### **4. Uso de antibióticos nos diluidores de sêmen**

A contaminação bacteriana é um dos fatores que podem influenciar a qualidade do sêmen resfriado, onde a redução da motilidade e danos no acrossoma podem ser observados, em decorrência do crescimento bacteriano e possível produção de endotoxinas de origem bacteriana, no meio diluidor do sêmen. Por este motivo, o uso de antibióticos nos meios diluidores tem sido uma prática muito utilizada, possibilitando o aumento do tempo de estocagem do ejaculado (BOUSSEAU et al., 1998; TONIOLLI et al., 2001).

A contaminação dos ejaculados pode ser oriunda de bactérias da flora uretral, do diluidor empregado ou de outros componentes utilizados como a gema de ovo (BOUSSEAU et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001). Bousseau e colaboradores (1998) encontraram contaminação bacteriana, tanto nos diluidores comerciais contendo gema de ovo, quanto na gema de ovo obtida de diferentes fontes (ex.: ovos inteiros oriundos de supermercados ou fazendas e gema de ovo de utilização industrial sob a forma líquida ou pó).

Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de testar os efeitos de diferentes antibióticos sobre a qualidade e preservação do sêmen de diversas espécies. Bons resultados foram demonstrados com o uso da gentamicina e da amicacina associada à penicilina G potássica sobre o sêmen resfriado do suíno (TONIOLLI et al., 2001) e equino (VARNER et al., 1998), respectivamente, e da ofloxacina para a criopreservação do sêmen humano (KING et al., 1997). Com relação ao sêmen canino, a maioria dos pesquisadores da atualidade emprega a benzilpenicilina associada à diidroestreptomicina ou estreptomicina na composição

dos diluidores do sêmen canino (ROTA et al., 1995; PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

## 5. Protetores de resfriamento

Um componente largamente utilizado na composição dos diluidores de sêmen é a gema de ovo, a qual foi atribuída propriedades nutritivas e protetoras de membrana contra o choque térmico (ENGLAND, 1993; RODRIGUES, 1997; MOUSSA et al., 2002).

Para a preservação do sêmen canino, a maioria dos autores utiliza concentrações de gema em torno de 20% no diluidor (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001). Visto que a gema de ovo tem uma capacidade de tampão, sua quantidade no meio varia de acordo com a capacidade tamponante dos outros componentes do diluidor (FARSTAD, 1996).

Moura (2000) comparou eficiência da gema de ovo de galinha e codorna como protetores de resfriamento na congelação do sêmen de cães e observou não existirem diferenças entre as mesmas quanto à conservação da motilidade, vigor e morfologia espermática após a descongelação. Assim, é sugestivo que a gema de ovo de codorna, que é bastante rica em ácido ascórbico e outras vitaminas, possa também ser utilizada na preservação do sêmen canino.

Diversos autores têm sugerido que a fração de baixa densidade da gema de ovo, principalmente composta por lipoproteínas de baixa densidade (LDL), poderia ser basicamente responsável pela resistência ao choque térmico e melhoria na motilidade (MOUSSA et al., 2002). Segundo Moussa et al., (2002) as lipoproteínas de baixa densidade poderiam aderir à superfície da membrana celular restaurando a perda de fosfolípidos e aparentemente induzindo a uma alteração transitória de sua composição, conseqüentemente, prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTAD, 1996).

As LDL são extremamente solúveis em meios à base de água, devido à sua baixa densidade, e não precipita após algumas horas, promovendo um filme interfacial entre os ácidos graxos e a água (MARTIN, 2005). Estudos recentes mostraram ser possível a purificação das LDL, permitindo sua utilização em substituição à gema de ovo integral (MOUSSA et al., 2002). Varela Jr. E colaboradores (2004) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de LDL purificada adicionada ao diluidor Tris para o resfriamento do sêmen do cão a 5 °C e observaram que concentrações entre 6 e 10% de LDL são tão eficientes quanto o uso de 20% de gema de ovo integral.

Apesar de seus conhecidos efeitos benéficos, as desvantagens dos diluidores que usam a gema de ovo integral são atribuídas à opacidade óptica, causada pelos grânulos formados, que dificultam o exame imediato à avaliação microscópica, o prejuízo causado à respiração do espermatozóide, a diminuição da motilidade e, ainda, podem transportar microorganismos patogênicos (BOUSSEAU et al., 1998; MARTIN, 2005). Além disso, ela favorece o processo de oxidação sobre os espermatozóides, podendo promover a peroxidação dos lipídios insaturados, à qual o espermatozóide canino é bastante sensível (RODRIGUES, 1997).

Por essas razões, foram conduzidas pesquisas visando a substituição da gema por outros lipídios sintéticos e purificados e observaram que os análogos do hidroxitolueno butilado (BHT) são interessantes substitutos por protegerem a membrana plasmática da injúria provocada pelo choque térmico (FARSTAD, 1996).

O dodecil sulfato de sódio (DSS) tem sido um componente adicionado aos diluidores para criopreservação do sêmen de diversas espécies como suíno, bovino, equino, camundongo e canino, conferindo maior motilidade, integridade acrossomal e alta taxa de fertilização, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (ROTA et al., 1997). Tendo-se encontrado que a incorporação do DSS aos diluidores de sêmen que contêm gema de ovo, confere proteção ao espermatozóide de diversas espécies contra o dano induzido pela criopreservação (ABOAGLA & TERADA, 2004).

O DSS é um detergente aniônico do grupo alquil iônico, solúvel em água, que age desnaturando proteínas de membrana, e que, quando em altas concentrações, pode solubilizar completamente membranas biológicas. A natureza da proteção exercida pelo DSS não é completamente conhecida, sugere-se que o efeito do DSS possa ser exercido diretamente no meio extracelular, solubilizando as lipoproteínas da gema do ovo e aumentando, desta forma, seu potencial de proteção (PEÑA, 2000).

Rota et al. (1997) incluíram a pasta Equex STM ao seu diluidor para o sêmen de cão e constataram sua ação benéfica sobre os espermatozóides. Os mesmos autores, em acordo com o citado anteriormente, sugeriram que a fração ativa do Equex, o DSS, deve estar envolvida com a solubilização e a ativação de componentes da gema de ovo.

Peña (2000) constatou que o Equex, quando utilizado em diluidores para o sêmen canino, exerceu um efeito protetor sobre as membranas espermáticas e sugeriu que o DSS possa ter reduzido a fase de transição lipídica e/ou protegido o funcionamento de bombas iônicas dos espermatozóides. Contudo, Peña (2000) alertou para o fato de que a exposição prolongada dos espermatozóides ao DSS ou às lipoproteínas da gema de ovo tratadas pelo

DSS, pode conferir um excesso de fluidez às membranas espermáticas indicando que seu efeito benéfico é dependente do tempo de exposição e da concentração deste no meio diluidor.

Acredita-se que o detergente DSS atua na solubilização e dispersão dos glóbulos da gema de ovo no diluidor, aumentando o contato entre o conteúdo protetor da mesma e a membrana plasmática do espermatozóide aumentando seu efeito protetor (ABOAGLA & TERADA, 2004). A hipótese que o DSS atua na solubilização de moléculas ativas da gema de ovo foi sustentada no fato de que quando o sobrenadante foi utilizado no preparo do diluidor, o DSS teve um importante efeito positivo sobre a motilidade pós-descongelação quando adicionado antes em vez após a centrifugação (ROTA et al., 1997). Foi verificada ainda, uma redução na viabilidade espermática quando o DSS é adicionado a diluidores sem gema de ovo, revelando que os detergentes, incluindo o DSS, têm um efeito espermicida (ROTA et al., 1997).

Peña e Linde-forsberg (2000) observaram que os espermatozóides caninos congelados na presença de DSS não apresentaram hiperativação após a descongelação. O mesmo não foi observado na ausência de DSS, indicando que este componente previne ou reduz alterações semelhantes à capacitação no espermatozóide canino. Por outro lado, a presença do DSS causa um grande influxo de cálcio no espermatozóide canino (PEÑA et al., 2003), o que também ocorre durante a capacitação.

A concentração ótima de DSS para o espermatozóide bovino varia de acordo com a concentração de gema de ovo utilizada no diluidor (PEÑA et al., 2003). Para a criopreservação do sêmen canino na presença de 20 % de gema de ovo, foram utilizadas as concentrações de 1 % (ROTA et al., 1997; PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000; PEÑA et al., 2003), e ainda foram observados melhores resultados utilizando as concentrações de 0,5; 0,75 e 1 % de DSS (TSUTSUI et al., 2000).

### 3. JUSTIFICATIVA

---

A indiscutível popularidade alcançada pelos cães e gatos como animais de estimação no final do século XX fez com que sua presença se tornasse definitiva no núcleo familiar moderno. Observa-se ainda o interesse dos criadores de cães em técnicas de reprodução assistida com finalidade de explorar a capacidade reprodutiva e avaliar a fertilidade desses animais, constituindo-se, atualmente, numa área em franca expansão (RODRIGUES, 2001). Por outro lado, as técnicas de reprodução artificial desenvolvidas em espécies domésticas, são importantes ferramentas na otimização do desempenho reprodutivo de espécies silvestres com dificuldade de adaptação ao cativeiro (GUIMARÃES, 2001).

Particularmente na espécie canina, tem-se observado um crescente interesse, por parte dos pesquisadores, no estudo da criopreservação do sêmen. Contudo, o transporte do sêmen criopreservado é limitado, principalmente, por implicações financeiras. Existindo uma real necessidade do desenvolvimento de biotécnicas que facilitem o intercâmbio do sêmen canino. Deste modo, o resfriamento apresenta-se alternativa promissora por ser uma técnica de menor custo, facilmente adaptado para o uso clínico, com regulamento para importação e exportação mais simples e taxas de gestação superiores ao do sêmen congelado (BOUCHARD et al., 1990; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001; PONGLOWHAPAN et al., 2004).

Além disso, diversos países diante do risco de introdução de doenças exóticas, têm buscado por diluidores isentos de produtos de origem animal a fim de garantir a segurança sanitária nos processos biológicos (BOUSSEAU et al., 1998; SAMPAIO NETO et al., 2002). Desse modo, a redução ou exclusão da gema de ovo nos diluidores à base de água de coco atenderiam bem a este requisito. Por outro lado, não sendo possível a exclusão da gema de ovo, a inclusão de detergentes como o dodecil sulfato de sódio no diluidor poderia potencializar a proteção conferida pela gema, possibilitando sua utilização em uma concentração mínima.

Ainda observa-se um pequeno número de trabalhos avaliando-se o sêmen canino diluído e resfriado, especialmente em ACP-106<sup>®</sup>. Vale ressaltar que o diluidor à base de água de coco é de baixo custo, de fácil preparo e sua matéria-prima existe em abundância no Nordeste do Brasil.

Dessa forma, o estudo sobre o resfriamento do sêmen canino diluído em ACP-106<sup>®</sup> é de grande importância, uma vez que abre a perspectiva de alternativas para a conservação do sêmen de reprodutores valiosos. Além do mais, o estudo de biotécnicas de sêmen canino servem como modelo a ser posteriormente testados para o sêmen de canídeos selvagens, tais como o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro vinagre (*Spheotos venaticus*) de ocorrência no Brasil e ameaçados de extinção.

## 4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

---

O diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106<sup>®</sup>) é eficiente para a conservação da qualidade do sêmen canino resfriado a 4 °C por até 72 horas.

A redução da concentração de gema de ovo no diluidor (ACP-106<sup>®</sup>) não altera a qualidade do sêmen canino resfriado.

O uso do dodecil sulfato de sódio na composição do diluidor (ACP-106<sup>®</sup>) possibilita melhor conservação do sêmen resfriado.

## 5. OBJETIVOS

---

### **Geral**

- ? Avaliar o desempenho do diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106<sup>®</sup>) para a conservação da qualidade do sêmen canino pelo resfriamento.

### **Específicos**

- ? Testar diferentes concentrações de gema de ovo para o resfriamento do sêmen canino diluído em ACP-106<sup>®</sup>;
- ? Avaliar o efeito da adição de dodecil sulfato de sódio (DSS) ao diluidor ACP-106<sup>®</sup> sobre a qualidade do sêmen canino resfriado.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### Desenho Experimental

Este trabalho foi dividido em dois experimentos distintos:

1. Influência da concentração de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP-106<sup>®</sup> e resfriado 4 °C.
2. Uso de dodecil sulfato de sódio no diluidor ACP-106<sup>®</sup> sobre a qualidade do sêmen canino resfriado 4 °C

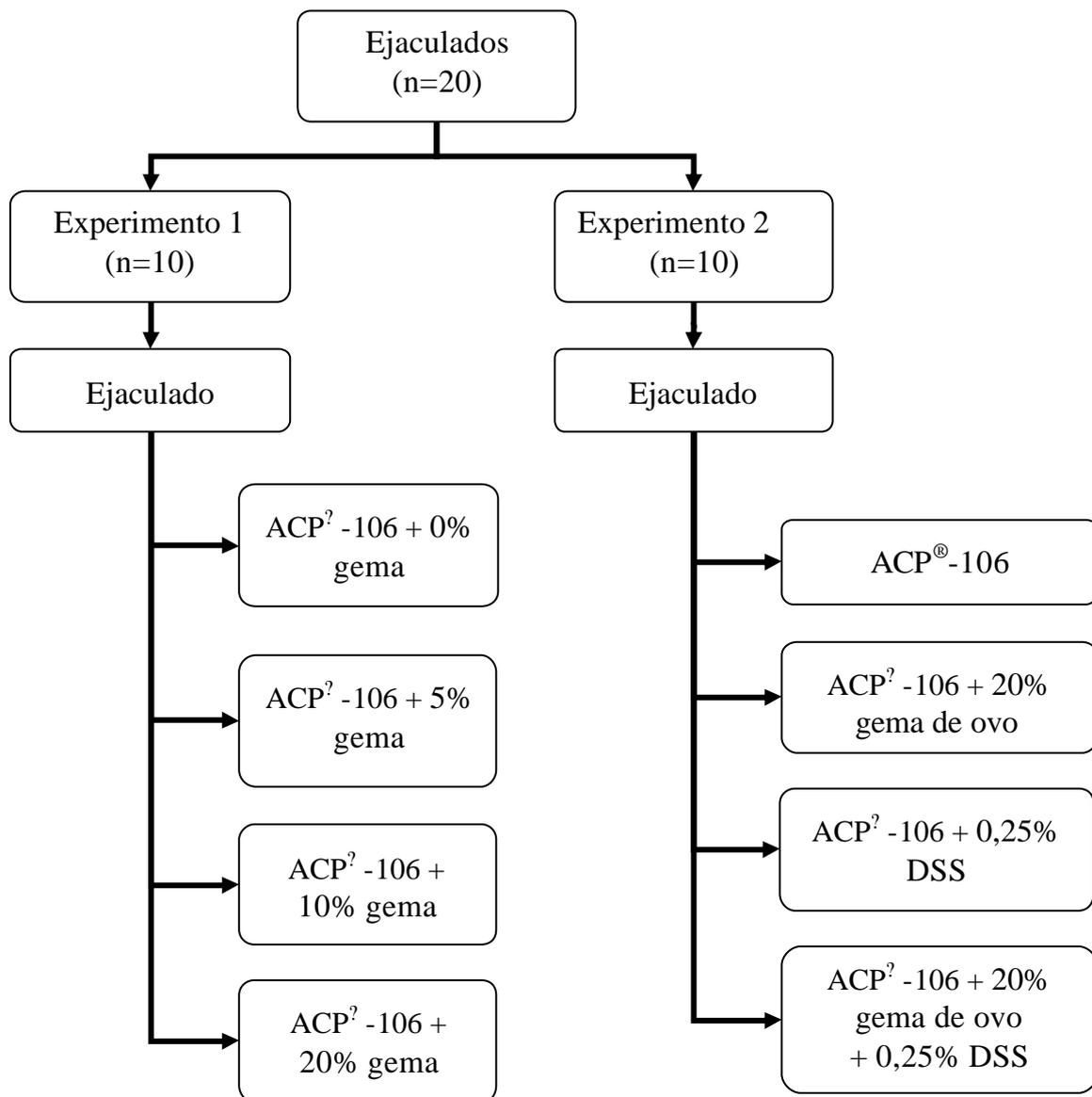


Figura 1. Desenho experimental adotado para a execução do trabalho de mestrado, utilizando-se 20 ejaculados caninos.

## **Animais Experimentais**

Foi utilizado um total de dez cães das raças American Pit Bull Terrier (n=5) e Boxer (n=5), oriundos de canis particulares, clinicamente sadios e de fertilidade comprovada. No experimento um, foram utilizados oito cães, sendo cinco da raça Boxer e três da raça American Pit Bull Terrier e no experimento dois, foram utilizados seis animais sendo três de cada raça. Os cães receberam alimentação à base de ração comercial peletizada e tiveram acesso à água *ad libitum*. Foram utilizados nos experimentos apenas ejaculados que apresentassem motilidade superior a 70 %, vigor = 3, e menos de 15 % de espermatozoides com alterações morfológicas.

## **Preparação dos diluidores**

O diluidor ACP-106<sup>®</sup> (ACP Biotecnologia<sup>®</sup>, Fortaleza-Ceará, Brasil) foi preparado segundo as recomendações do fabricante. Foi acrescido sulfato de diidroestreptomicina<sup>1</sup> (1mg/mL) e benzilpenicilina sódica<sup>1</sup> (1500 UI/mL). O diluidor assim preparado apresentou pH de 6,8 e osmolaridade de 300 mOsm/L. Em cada experimento os diluidor ACP-106<sup>®</sup> recebeu os seguintes aditivos, consistindo nos seguintes grupo-tratamento:

### ? Experimento 1

- ACP-106<sup>®</sup> sem adição de gema de ovo;
- ACP-106<sup>®</sup> contendo 5% de gema de ovo;
- ACP-106<sup>®</sup> contendo 10% de gema de ovo;
- ACP-106<sup>®</sup> contendo 20% de gema de ovo.

### ? Experimento 2

- ACP-106<sup>®</sup> sem aditivos;
- ACP-106<sup>®</sup> contendo 20% de gema de ovo;
- ACP-106<sup>®</sup> contendo 0,25% de DSS;
- ACP-106<sup>®</sup> contendo 20% de gema de ovo e 0,25% de DSS.

Após o preparo, os diluidores foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos e utilizado o sobrenadante.

## **Coleta e processamento do sêmen**

O sêmen foi coletado de acordo com a disponibilidade dos animais, através da técnica de manipulação digital do bulbo peniano (CHRISTIANSEN, 1988) com o auxílio de um funil

---

1. Pentabiótico Veterinário, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas/SP, Brasil.

plástico e tubos graduados. A segunda fração do ejaculado, rica em espermatozóides, foi retida para fins de avaliação e posterior resfriamento.

Logo após a coleta, foi realizada avaliação dos parâmetros físico-químicos e microscópicos do sêmen e, em seguida, foi realizada a separação em alíquotas de igual volume que foram diluídas na proporção adequada para que atingissem uma concentração final de  $1 \times 10^8$  spz/mL e realizada nova avaliação dos parâmetros microscópicos. As mesmas foram acondicionadas numa caixa térmica contendo gelo reciclável (5 °C) por 60 minutos, iniciando-se o resfriamento e, posteriormente, foram transferidas para um refrigerador<sup>2</sup> a 4 °C perfazendo uma curva de resfriamento de -0,33 °C/min. Após 24 horas, as alíquotas foram transferidas para uma bandeja contendo uma estante plástica para tubos imersa em aproximadamente três litros de água destilada a 4 °C, afim de possibilitar uma oscilação máxima de 1 °C. A temperatura da água, na qual os tubos estavam imersos, foi monitorada diariamente, sendo verificada os valores máximo e mínimo com auxílio de um termômetro digital<sup>3</sup> instalado no lado de fora do refrigerador, porém com sensor de temperatura imerso na água da bandeja.

A fim de avaliar a sobrevivência espermática, uma alíquota de 50 µL das amostras de sêmen resfriadas foram reaquecidas em banho-maria a 37 °C e avaliadas microscopicamente, a cada 24 horas até que não fossem mais observados espermatozóides móveis no experimento 1 e até o quinto dia no experimento 2.

### **Avaliação do sêmen**

O sêmen coletado foi avaliado quanto aos seus parâmetros físico-químicos e microscópicos. As avaliações dos parâmetros físico-químicos incluíram: cor, viscosidade, volume, concentração espermática e pH através de fitas indicadoras (pH-Fix 0-14, Macherey-Nagel<sup>®</sup>). Já as análises microscópicas incluíram: motilidade, vigor, funcionalidade de membrana, morfologia espermática e acrossomal.

A avaliação da motilidade e do vigor foi realizada subjetivamente com auxílio da microscopia óptica, em aumento de 100 x, onde a motilidade foi expressa em percentual de espermatozóides móveis e o vigor em uma escala de 0 a 5 (CHRISTIANSEN, 1988).

A concentração espermática foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer (CBRA, 1998).

Para a avaliação da morfologia espermática e acrossomal, foram utilizados esfregaços corados com rosa de bengala, sendo contadas 200 células por lâmina em microscópio de contraste de fase (1000 x). Na avaliação morfológica, os espermatozóides foram classificados

como normais ou apresentando alterações primárias ou secundárias (CHRISTIANSEN, 1988). Os acrossomas foram classificados como normais, destacados, ausentes, vesiculados, edemaciados ou com distribuição anormal (OETTLÉ, 1993).

Para a avaliação da funcionalidade da membrana espermática, foi utilizado o teste hiposmótico (JEYENDRAN et al., 1984) no sêmen fresco e resfriado. Foi utilizada uma solução hiposmótica (150 mOsmol) constituída de citrato de sódio (7,35 g), frutose (13,51 g) e água destilada autoclavada (1000 mL). Uma alíquota de 5? L de sêmen foi diluída em 45? L da solução hiposmótica e levada ao banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após o término do período de incubação, uma alíquota foi colocada em lâmina, coberta com lamínula, e avaliada em microscópio óptico no aumento de 400x. Foram contadas 200 células e do total de espermatozóides com cauda enrolada foi subtraído o número de espermatozóides que apresentaram a mesma alteração na avaliação morfológica em esfregaços corados. Os espermatozóides apresentando enrolamento de cauda, indicativo de edema, foram considerados como apresentando membrana funcional.

### **Análise estatística**

Os dados de cor e viscosidade da segunda fração do sêmen foram descritos de forma subjetiva. Os demais parâmetros foram expressos na forma de média e desvio padrão e analisados pelo *software* Statview 5.0 (SAS Institute Inc., 1998). As diferenças entre os cães no que se refere às características do sêmen fresco foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Para a motilidade, morfologia e funcionalidade de membrana foi empregada a transformação angular. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade KS. Com a finalidade de comparar os grupos, foi empregado o teste t de Student para os parâmetros de motilidade, porcentagem de espermatozóides e acrossomas morfológicamente normais, membranas funcionais e pH. Para o vigor, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Cada tratamento foi realizado em dez replicatas. Para efeito de comparação entre os grupos no primeiro experimento foram consideradas as diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) até o sétimo dia de resfriamento. Para o segundo experimento, foram consideradas as diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) durante os cinco dias de resfriamento.

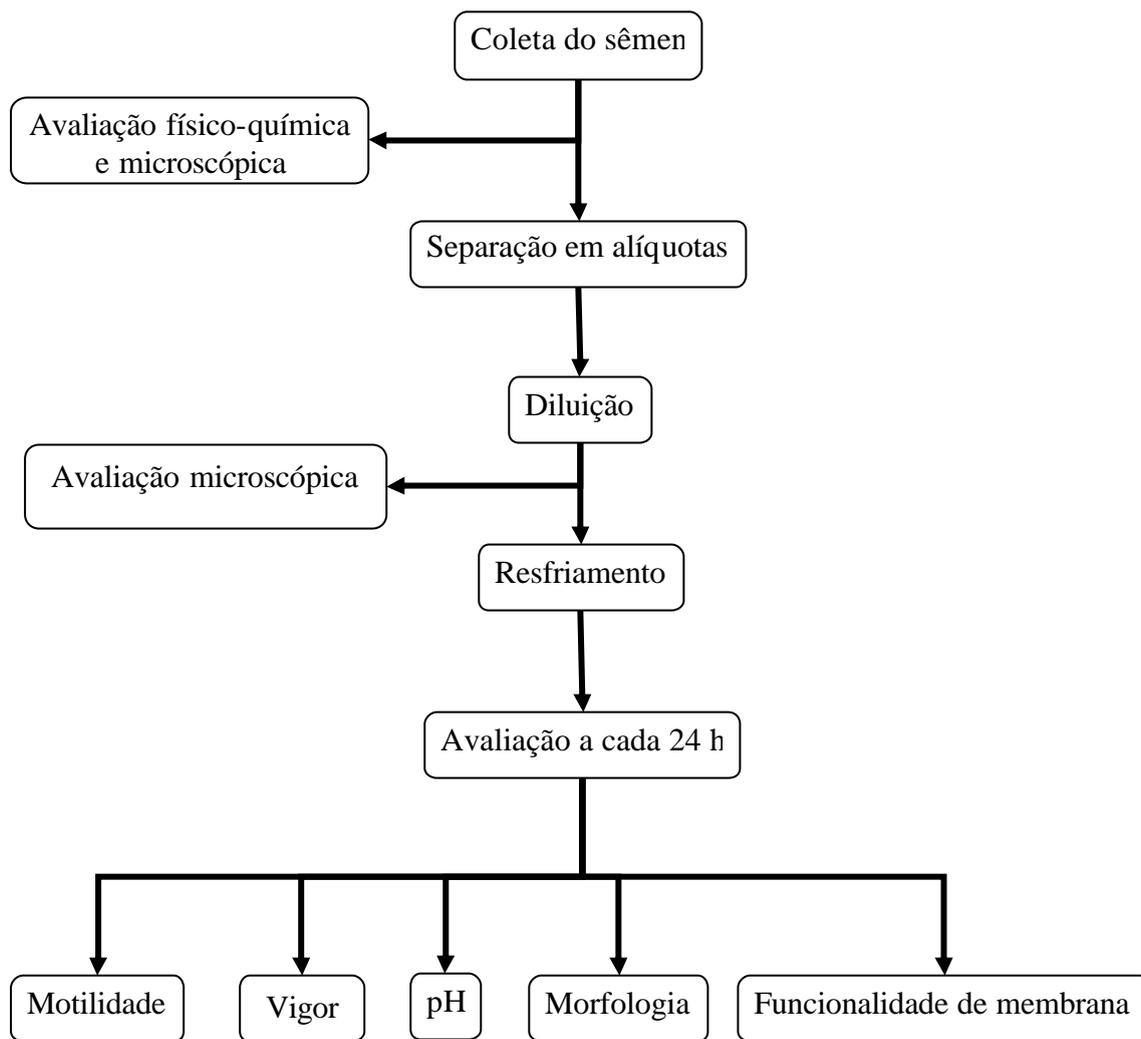


Figura 2. Processamento do sêmen adotado para a execução do trabalho de mestrado nos experimentos 1 e 2.

## 7. RESULTADOS

### Experimento 1

Todos os ejaculados obtidos apresentaram cor branca opalescente e viscosidade leitosa. Os valores espermáticos de motilidade, vigor, concentração e morfologia estão apresentados na tabela 1. A análise estatística demonstrou que os animais experimentais representaram uma população homogênea, uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre eles ( $P>0,05$ ).

Tabela 1. Características (média  $\pm$  dp) dos ejaculados frescos (n=10) dos animais no experimento 1

<b>Parâmetro</b>	<b>Média <math>\pm</math> dp</b>
Volume (mL)	1,22 $\pm$ 0,58
Motilidade (%)	98,5 $\pm$ 2,4
Vigor (0-5)	5,0 $\pm$ 0
Espermatozóides morfologicamente normais (%)	92,1 $\pm$ 4,41
Espermatozóides com membrana funcional (%)	91,25 $\pm$ 5,50
Acrossomas normais (%)	97,9 $\pm$ 2,42
Concentração espermática ( $\times 10^6$ spztz/mL)	687 $\pm$ 292,54
pH	7,0 $\pm$ 0

$P>0,05$  (Teste de Kruskal-Wallis).

Após a diluição e do segundo ao terceiro dia, a motilidade e o vigor foram preservados de maneira semelhante por todos os grupos empregados (Tabelas 2 e 4). No primeiro dia de resfriamento, a inclusão de 20% de gema de ovo, possibilitou uma melhor conservação da motilidade quando comparada aos grupos contendo 5% ou na ausência da gema e o grupo contendo 10% de gema foi semelhante aos demais grupos. Neste mesmo tempo, a inclusão de 20% de gema de ovo, possibilitou uma melhor conservação do vigor espermático em comparação ao grupo contendo 5% e os grupos 0% e 10% não diferiram dos demais. Do quarto ao sexto dia de resfriamento, houve uma melhor conservação da motilidade e do vigor no grupo que não continha gema de ovo em relação ao contendo 5% de gema. Os grupos contendo 10% e 20% de gema não diferiram dos demais. Após sete dias de resfriamento, o

grupo que não continha gema de ovo apresentou motilidade e vigor superiores aos grupos contendo 5% e 10% de gema. O grupo contendo 20% de gema de ovo não diferiu dos demais grupos.

Tabela 2. Motilidade do sêmen canino após a diluição (dil) em ACP-106® contendo diferentes concentrações de gema de ovo e resfriamento a 4 °C

Dias	Concentração de gema de ovo			
	0%	5%	10%	20%
Dil	96,5 ± 4,12a	98,0 ± 2,59a	98,5 ± 2,42a	98,5 ± 2,42a
1	70,0 ± 26,67a	75,5 ± 16,41a	86,5 ± 9,73ab	90,3 ± 6,13b
2	61,0 ± 23,78a	50,5 ± 30,04a	61,0 ± 36,88a	72,8 ± 27,70a
3	51,0 ± 22,34a	34,0 ± 37,18a	41,0 ± 41,69a	47,5 ± 39,25a
4	41,0 ± 20,25a	16,0 ± 29,51b	35,0 ± 37,49ab	37,5 ± 37,80ab
5	33,5 ± 21,86a	5,0 ± 15,81b	22,0 ± 29,36ab	22,5 ± 29,74ab
6	23,5 ± 21,09a	3,0 ± 9,49b	12,0 ± 20,98ab	18,0 ± 25,30ab
7	18,5 ± 17,65a	0,5 ± 1,58b	4 ± 12,65b	13,0 ± 19,47ab
8	13,0 ± 17,029	0 ± 0	2,0 ± 6,32	7,5 ± 13,18
9	9,0 ± 12,65	0 ± 0	0 ± 0	1,0 ± 3,16
10	5,0 ± 8,50	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
11	4,5 ± 8,32	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
12	3,0 ± 6,749	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
13	2,0 ± 4,22	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
14	1,5 ± 3,37	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
15	0,5 ± 1,58	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
16	0,1 ± 0,32	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
17	0,05 ± 0,16	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
18	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

a, b na mesma linha:  $P < 0,05$ .

Neste trabalho, a morfologia espermática foi protegida de maneira semelhante pelo diluidor ACP-106® acrescido ou não de gema de ovo (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais (média  $\pm$  dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP-106<sup>®</sup> contendo diferentes concentrações de gema de ovo

Dias	Concentração de gema de ovo			
	0%	5%	10%	20%
Dil	91,05 $\pm$ 3,99	93,15 $\pm$ 2,24	91,75 $\pm$ 6,02	92,55 $\pm$ 3,76
1	85,5 $\pm$ 5,28	88,7 $\pm$ 5,77	87,35 $\pm$ 6,36	86,5 $\pm$ 4,30
2	84,17 $\pm$ 6,93	88,1 $\pm$ 4,79	85,7 $\pm$ 6,45	85,1 $\pm$ 5,28
3	83,33 $\pm$ 6,84	85,3 $\pm$ 5,72	83,88 $\pm$ 5,87	83,44 $\pm$ 5,48
4	82,56 $\pm$ 7,54	83,2 $\pm$ 7,60	84,71 $\pm$ 7,30	82,86 $\pm$ 6,01
5	80,22 $\pm$ 9,51	81,67 $\pm$ 4,04	79,6 $\pm$ 9,02	80,71 $\pm$ 6,99

$P > 0,05$

A principal diferença entre os grupos foi em relação ao pH. Após o resfriamento, foi observada uma redução do pH nos diluidores que continham gema de ovo (Tabela 5). Nos dias três a cinco de resfriamento, essa redução no pH foi significativa nos grupos que continham 5, 10 e 20% de gema de ovo. Houve uma redução significativa no pH do grupo 20% comparado ao grupo sem gema de ovo no segundo dia de resfriamento. No quarto dia, o grupo 0% manteve seu pH inalterado, havendo uma redução significativa no pH dos demais grupos. No dia cinco, foi observado quadro semelhante ao dia anterior.

Após o resfriamento, foi observada uma redução no percentual de espermatozóides com membranas funcionais (Tabela 6). No dia quatro, a ausência de gema de ovo no diluidor melhor protegeu a integridade funcional de membrana apenas em relação ao diluidor que continha 5% de gema de ovo, nos demais dias, a funcionalidade de membrana foi semelhante entre os grupos.

Em relação à morfologia acrossomal, a inclusão de gema de ovo aos diluidores possibilitou uma melhor conservação em comparação ao diluidor sem gema de ovo um dia após o início do resfriamento (Tabela 7). Nos demais dias, os diluidores conservaram de maneira semelhante à morfologia acrossomal.

Tabela 4. Vigor do sêmen canino após a diluição (dil) em ACP-106@contendo diferentes concentrações de gema de ovo e resfriamento a 4 °C

Dias	Concentração de gema de ovo			
	0%	5%	10%	20%
Dil	5,0 ± 0a	5,0 ± 0a	5,0 ± 0a	5,0 ± 0a
1	3,8 ± 1,55ab	3,95 ± 0,76a	4,6 ± 0,70b	4,7 ± 0,42b
2	3,5 ± 1,43a	3,25 ± 1,44a	3,55 ± 1,98a	4,0 ± 1,55a
3	2,9 ± 1,29a	2,05 ± 2,22a	2,4 ± 2,17a	2,85 ± 2,19a
4	2,8 ± 1,23a	1,0 ± 1,70b	2,15 ± 2,29ab	2,3 ± 1,95ab
5	2,2 ± 1,03a	0,4 ± 1,26b	1,4 ± 1,84ab	1,6 ± 1,90ab
6	1,9 ± 1,37a	0,3 0,95±b	0,8 ± 1,40ab	1,3 ± 1,77ab
7	1,7 ± 1,34a	0,1 ± 0,32b	0,3 ± 0,95b	1,1 ± 1,45ab
8	1,2 ± 1,32	0 ± 0	0,2 ± 0,63	1,0 ± 1,41
9	1,1 ± 1,29	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,63
10	0,5 ± 0,85	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
11	0,4 ± 0,70	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
12	0,3 ± 0,67	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
13	0,3 ± 0,67	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
14	0,2 ± 0,42	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
15	0,1 ± 0,32	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
16	0,1 ± 0,32	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
17	0,1 ± 0,32	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
18	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

a, b na mesma linha:  $P < 0,05$ ..

Tabela 5. Valores de pH (média  $\pm$  dp) do sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP-106® contendo diferentes concentrações de gema de ovo

Dias	Concentração de gema de ovo			
	0%	5%	10%	20%
Dil	7,0 $\pm$ 0a	7,0 $\pm$ 0a	7,0 $\pm$ 0a	7,0 $\pm$ 0a
1	7,0 $\pm$ 0a	7,0 $\pm$ 0a	7,0 $\pm$ 0a	6,8 $\pm$ 0,42a
2	7,0 $\pm$ 0a	6,8 $\pm$ 0,42ab	6,7 $\pm$ 0,48ab	6,4 $\pm$ 0,52b
3	7,0 $\pm$ 0a	6,5 $\pm$ 0,53b	6,44 $\pm$ 0,53b	6,1 $\pm$ 0,32b
4	7,0 $\pm$ 0a	6,5 $\pm$ 0,55b	6,17 $\pm$ 0,41bc	6,0 $\pm$ 0c
5	6,89 $\pm$ 0,34a	6,0 $\pm$ 0b	6,0 $\pm$ 0b	6,0 $\pm$ 0b

a, b, c na mesma linha:  $P < 0,05$ .

Tabela 6. Porcentagem de espermatozoides apresentando membranas funcionais (média  $\pm$  dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP-106® contendo diferentes concentrações de gema de ovo

Dias	Concentração de gema de ovo			
	0%	5%	10%	20%
Dil	86,85 $\pm$ 7,24a	89,8 $\pm$ 6,32a	90,75 $\pm$ 2,99a	90,6 $\pm$ 4,38a
1	75,4 $\pm$ 9,78a	78,35 $\pm$ 13,13a	82,15 $\pm$ 10,05a	79,15 $\pm$ 9,32a
2	71,65 $\pm$ 9,67a	75,95 $\pm$ 13,83a	79,6 $\pm$ 10,71a	72,1 $\pm$ 12,73a
3	71,33 $\pm$ 9,90a	67,0 $\pm$ 10,17a	69,13 $\pm$ 16,05a	72,56 $\pm$ 8,79a
4	64,78 $\pm$ 12,36a	63,5 $\pm$ 7,65b	63,93 $\pm$ 15,40ab	66,93 $\pm$ 15,69ab
5	61,89 $\pm$ 6,47a	52,6 $\pm$ 12,29a	64,83 $\pm$ 10,97a	60,43 $\pm$ 26,80a

a, b na mesma linha :  $P < 0,05$ .

Tabela 7. Porcentagem de espermatozoides apresentando acrossomas morfologicamente normais (média  $\pm$  dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP-106<sup>®</sup> contendo diferentes concentrações de gema de ovo

Dias	Concentração de gema de ovo			
	0%	5%	10%	20%
Dil	97,2 $\pm$ 1,48a	97,0 $\pm$ 1,25a	96,0 $\pm$ 1,41a	95,8 $\pm$ 2,044a
1	87,1 $\pm$ 6,87a	92,0 $\pm$ 4,47b	90,1 $\pm$ 5,61b	90,3 $\pm$ 4,24b
2	85,67 $\pm$ 6,847a	84,4 $\pm$ 7,62a	86,3 $\pm$ 7,15a	85,6 $\pm$ 6,10a
3	85,0 $\pm$ 6,32a	85,0 $\pm$ 6,80a	83,13 $\pm$ 9,45a	84,11 $\pm$ 7,62a
4	83,22 $\pm$ 10,65a	76,6 $\pm$ 11,35a	84,29 $\pm$ 9,45a	80,29 $\pm$ 8,69a
5	83,89 $\pm$ 10,71a	81,0 $\pm$ 5,0a	73,0 $\pm$ 18,52a	80,0 $\pm$ 12,45a

a,b na mesma linha:  $P < 0,05$ .

## Experimento 2

Todos os ejaculados obtidos apresentaram cor branca opalescente e viscosidade leitosa. Os valores espermáticos de motilidade, vigor, concentração e morfologia estão apresentados na tabela 6. A análise estatística demonstrou que, assim como no experimento 1, os animais experimentais representaram uma população homogênea, uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre eles ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 8. Características (média  $\pm$  dp) dos ejaculados frescos (n=10) dos animais no experimento 2

Parâmetro	Média $\pm$ dp
Volume (mL)	1,41 $\pm$ 0,94
Motilidade (%)	99,5 $\pm$ 1,58
Vigor (0-5)	5,0 $\pm$ 0
Espermatozoides morfologicamente normais (%)	95,3 $\pm$ 3,23
Espermatozoides com membrana funcional (%)	94,5 $\pm$ 3,14
Acrossomas normais (%)	98,8 $\pm$ 1,14
Concentração espermática ( $\times 10^6$ spz/mL)	645 $\pm$ 239,97
pH	7,0 $\pm$ 0

$P > 0,01$  (Teste de Kruskal-Wallis)

Após a diluição, foi observada ausência de espermatozóides móveis e vigor em todas as alíquotas diluídas em ACP-106<sup>®</sup> contendo DSS sem gema de ovo, estas foram excluídas das avaliações nos dias seguintes. Neste mesmo tempo de avaliação, a redução na motilidade e no vigor no grupo DSS foi significativa e os demais grupos apresentaram motilidade semelhante (Tabelas 9 e 10). Nos dias um a três, a motilidade e o vigor foram conservados de maneira semelhante nos grupos contendo aditivos, contudo foi significativamente inferior nas alíquotas diluídas em ACP-106<sup>®</sup> sem aditivos. Já nos dias quatro e cinco, a diluição em ACP-106<sup>®</sup> na presença de gema de ovo, possibilitou uma melhor conservação da motilidade e do vigor quando comparada ao grupo sem aditivos. Neste mesmo tempo, o grupo contendo gema e DSS foi semelhante aos demais. Durante todo o período de avaliação, a adição de gema de ovo resultou em motilidade estatisticamente semelhante à adição de gema de ovo e 0,25% de DSS.

Tabela 9. Motilidade dos espermatozóides caninos após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106<sup>®</sup> adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio (DSS)

Dias	Grupos			
	ACP-106 <sup>®</sup>	Gema	Gema + DSS	DSS
Dil	97,5 ± 3,54a	99,0 ± 2,11a	98,7 ± 2,16a	0 ± 0b
1	72,0 ± 12,29a	92,5 ± 2,64b	93,6 ± 2,50b	0 ± 0c
2	56,0 ± 22,71a	84,5 ± 4,97b	83,5 ± 7,47b	0 ± 0c
3	42,0 ± 23,48a	77,0 ± 6,32b	72,5 ± 13,59b	0 ± 0c
4	33,0 ± 21,11a	67,0 ± 8,23b	51,3 ± 30,79ab	0 ± 0c
5	25,0 ± 20,14a	60,0 ± 11,55b	35,1 ± 33,27ab	0 ± 0c

*a, b, c na mesma linha: P < 0,01.*

Tabela 10. Vigor dos espermatozoides caninos após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106® adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio (DSS)

Dias	Grupos			
	ACP-106®	Gema	Gema + DSS	DSS
Dil	5,0 ± 0a	5,0 ± 0a	5,0 ± 0a	0 ± 0b
1	3,5 ± 0,71a	4,8 ± 0,42b	4,8 ± 0,42b	0 ± 0c
2	2,9 ± 1,10a	4,0 ± 0b	4,0 ± 0,47b	0 ± 0c
3	2,3 ± 0,95a	3,8 ± 0,42b	3,5 ± 0,53b	0 ± 0c
4	2,0 ± 1,15a	3,1 ± 0,32b	2,35 ± 1,38ab	0 ± 0c
5	2,0 ± 1,15a	3,0 ± 0b	1,7 ± 1,49ab	0 ± 0c

*a, b, c na mesma linha: P<0,05*

Tabela 11. Valores de pH (média ± dp) do sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106® adicionado ou não de gema e dodecil sulfato de sódio (DSS)

Dias	Grupos			
	ACP-106®	Gema	Gema + DSS	DSS
Dil	7 ± 0a	7 ± 0a	7 ± 0a	7 ± 0a
1	7 ± 0a	6,1 ± 0,32b	6,2 ± 0,42b	-
2	7 ± 0a	6 ± 0a	6 ± 0a	-
3	7 ± 0a	6 ± 0a	6 ± 0a	-
4	7 ± 0a	6 ± 0a	6 ± 0a	-
5	7 ± 0a	6 ± 0a	6 ± 0a	-

*a, b na mesma linha: P<0,0001.*

Neste experimento, a morfologia foi significativamente ( $P < 0,0001$ ) afetada pela diluição em ACP-106<sup>®</sup> associado ao DSS na ausência da gema de ovo, como observado pela redução na porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais (Figura 3). Nos dois primeiros e no último dia de avaliação, a morfologia foi protegida de maneira semelhante nos grupos testados ( $P > 0,01$ ). No dia três, a adição de gema de ovo e 0,25% de DSS promoveu uma proteção da morfologia significativamente superior ( $P < 0,05$ ) aos demais grupos, que não diferiram entre si ( $P = 0,8024$ ). No dia quatro, o grupo contendo gema e DSS protegeu melhor a morfologia espermática ( $P < 0,05$ ) apenas quando comparado ao grupo sem aditivos.

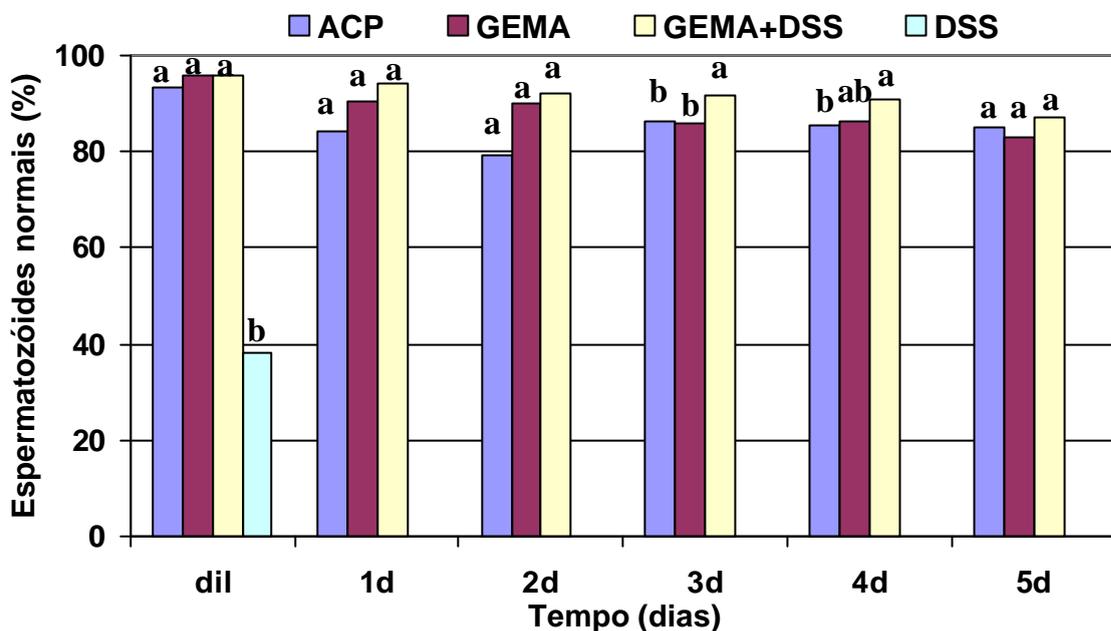


Figura 3. Porcentagem de espermatozoides caninos morfologicamente normais após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106<sup>®</sup> adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio (DSS).

*a, b no mesmo tempo de avaliação:  $P < 0,05$*

O pH dos diluidores diferiu apenas após um dia de resfriamento (Tabela 11), onde os grupos com a inclusão de gema de ovo como aditivo apresentaram valores significativamente inferiores em comparação com a utilização do diluidor ACP-106<sup>®</sup> sem aditivos ( $P < 0,0001$ ).

Em relação ao percentual de membranas funcionais, avaliadas pelo teste hiposmótico, após a diluição foi observada uma redução significativa no diluidor ACP-106<sup>®</sup> contendo 0,25% de DSS (Figura 4). Neste mesmo período, os demais grupos possibilitaram a conservação da funcionalidade de membrana de maneira semelhante. Após um dia de

resfriamento, a diluição em ACP-106<sup>®</sup> sem aditivos resultou em um percentual inferior ( $P < 0,05$ ) de membranas funcionais quando comparado com os demais grupos. Nos demais dias, houve uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) no percentual de espermatozoides com membranas funcionais no grupo ACP-106<sup>®</sup>, comparado ao grupo que recebeu adição de gema de ovo. O grupo contendo gema e 0,25% de DSS não diferiu ( $P > 0,05$ ) dos demais do segundo ao quinto dia de resfriamento.

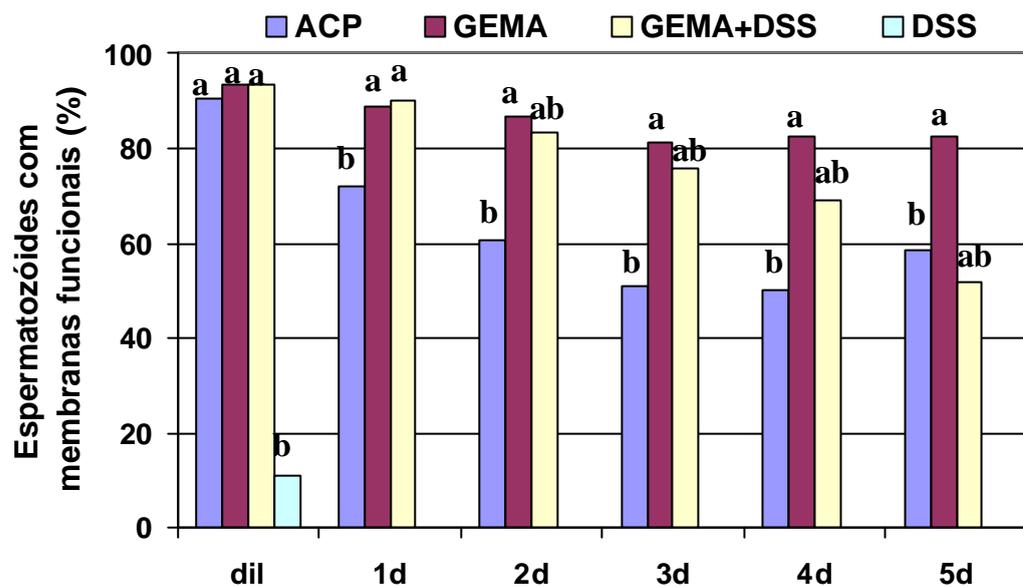


Figura 4. Porcentagem de espermatozoides caninos apresentando membranas funcionais após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106<sup>®</sup> adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio (DSS).

*a, b no mesmo tempo de avaliação:  $P < 0,05$*

Tabela 12. Porcentagem de espermatozoides apresentando acrossomas morfolologicamente normais (média  $\pm$  dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento a 4 °C em ACP-106<sup>®</sup> adicionado ou não de gema de ovo e dodecil sulfato de sódio (DSS)

Dias	Grupos			
	ACP-106 <sup>®</sup>	Gema	Gema + DSS	DSS
Dil	99,2 $\pm$ 0,92a	99,5 $\pm$ 1,27a	99,0 $\pm$ 0,49a	19,7 $\pm$ 15,598b
1	97,3 $\pm$ 1,57a	97,6 $\pm$ 1,65a	96,2 $\pm$ 2,53a	-
2	94,4 $\pm$ 2,59a	97,6 $\pm$ 1,78b	93,0 $\pm$ 3,20a	-
3	92,6 $\pm$ 2,76a	95,9 $\pm$ 2,69b	89,8 $\pm$ 3,49a	-
4	82,11 $\pm$ 14,32a	93,6 $\pm$ 2,27b	87,2 $\pm$ 5,43a	-
5	79,63 $\pm$ 12,94a	92,78 $\pm$ 3,87b	85,0 $\pm$ 6,60ab	-

a, b na mesma linha:  $P=0,01$ .

Como demonstrado para os demais parâmetros, a adição de 0,25% de DSS na ausência da gema de ovo, levou a uma redução significativa no percentual de acrossomas morfolologicamente normais quando comparado aos demais grupos (Tabela 12). Após a diluição e no primeiro dia de resfriamento, os grupos contendo aditivos, exceto o grupo DSS, conservaram a morfologia acrossomal de maneira semelhante ( $P>0,01$ ). Nos dias dois a quatro, a morfologia acrossomal foi melhor protegida pelo diluidor ACP-106<sup>®</sup> adicionado de gema de ovo. No último dia de resfriamento, a diluição em ACP-106<sup>®</sup> adicionado de gema de ovo conservou a morfologia acrossomal de forma superior apenas ao grupo sem gema, não deferindo do grupo contendo gema e DSS.

## 8. DISCUSSÃO

---

Os parâmetros encontrados no sêmen fresco nos dois experimentos estavam de acordo com a faixa de normalidade para a espécie canina (OETTLÉ, 1993; JOHNSTON et al., 2001).

Após o resfriamento, foi observado um declínio progressivo na motilidade e no vigor. Segundo Chantler et al. (2000), esse fenômeno se deve a sensibilidade espermática à redução da temperatura, culminando com decréscimo progressivo de sua motilidade quando submetido ao resfriamento. Esse fenômeno tem sido atribuído à sensibilidade térmica da bomba sódio-potássio-ATPase e subsequente dispersão de íons (PONGLOWHAPAN et al., 2004).

### Experimento 1

Após um dia de resfriamento, no grupo contendo 20% de gema de ovo, houve uma melhor conservação da motilidade quando comparada aos grupos contendo zero e 5%. Esse efeito benéfico de gema de ovo na preservação de motilidade do espermatozóide canino foi demonstrado previamente por Iguer-Ouada & Versteegen (2001). No mesmo tempo de avaliação, a inclusão de 10% de gema de ovo no diluidor resultou em motilidade semelhante à inclusão de 20%. Em relação ao vigor, a inclusão de 20% de gema de ovo, possibilitou uma melhor conservação apenas em relação o grupo contendo 5% de gema. Apesar da comprovada eficácia da inclusão da gema de ovo, nos demais dias de avaliação, a sua inclusão não possibilitou um maior percentual de espermatozóides móveis e vigor quando comparado ao grupo sem gema. Esse resultado poderia ser atribuído à acidificação dos meios diluidores ou aos efeitos deletérios oriundos da inclusão da gema de ovo. Martin (2005) relatou que entre as desvantagens dos diluidores que usam a gema de ovo integral está o prejuízo causado à respiração do espermatozóide, diminuição da motilidade ou ainda a contaminação por microorganismos patogênicos. Segundo Toniolli et al. (2001), a contaminação bacteriana é um dos fatores que podem influenciar a qualidade do sêmen resfriado, onde a redução da motilidade e danos no acrossoma podem ser observados, em decorrência do crescimento bacteriano e possível produção de endotoxinas de origem bacteriana, no meio diluidor do sêmen.

A morfologia espermática é um parâmetro indispensável na avaliação seminal, pois está intrinsecamente implicada a problemas na fertilidade tanto na espécie canina como em

outras espécies animais (OETTLÉ, 1993). Neste trabalho, os diluidores empregados foram igualmente eficientes para a conservação da morfologia espermática, resultando em um percentual de espermatozói-de normais acima de 79%. Oettlé (1993) relata que à medida que se aumenta o percentual de espermatozói-des anormais, a fertilidade é reduzida, sendo que quando a proporção de espermatozói-des morfolologicamente normais está abaixo de 60%, a fertilidade é negativamente afetada.

A inclusão de gema de ovo ao diluidor ACP-106<sup>®</sup> provocou acidificação no meio de conservação após dois dias de resfriamento. Esse fato poderia estar associado a diversos possibilidades: possível alteração na capacidade tamponante do diluidor, crescimento de microorganismos presentes na gema de ovo ou produção excessiva de metabólitos.

Bousseau e colaboradores (1998) encontraram contaminação bacteriana, tanto nos diluidores comerciais contendo gema de ovo, quanto na gema de ovo obtida de ovos inteiros oriundos de supermercados ou fazendas e da gema de ovo de utilização industrial sob a forma líquida ou pó. No presente trabalho, foram adicionados antibióticos no meio diluidor, porém esses podem ter apresentado baixa eficiência frente ao possível desafio com os microorganismos oriundos da gema de ovo.

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana espermática (SPITTALER & TYLER, 1985), sendo essa importante para o metabolismo espermático. É um teste que determina as mudanças na membrana espermática, onde o transporte através dessa é um processo bioquímico importante para a viabilidade espermática e capacidade fertilizante (JEYENDRAN et al., 1984). A proteção da integridade funcional observada pela ausência de gema de ovo no dia quatro pode indicar que a inclusão de 5% de gema de ovo foi suficiente para promover a alteração do pH e promover efeitos negativos conseqüentes, o que não foi observado nos grupos que continham 10 e 20% de gema de ovo, onde supõe-se que a proteção conferida pela gema de ovo foi superior aos efeitos indesejáveis promovidos pela acidificação do meio diluidor.

Em relação à morfologia acrossomal, houve um efeito protetor da inclusão de 10 ou 20% de gema de ovo, no primeiro dia de resfriamento, assim como observado para a motilidade. Iguer-Ouada & Verstegen (2001) demonstraram que a gema de ovo apresentava um efeito protetor sobre o acrossoma. Esse efeito refletiu-se em melhor conservação da integridade acrossomal e prevenção da ocorrência da reação acrossômica espontânea nos diluidores contendo 20% de gema de ovo. Por outro lado, açúcares como a glicose, frutose e sacarose presentes na água de coco poderiam ter conferido proteção ao espermatozói-de. Yildiz et al. (2000), demonstraram para a criopreservação do sêmen canino que a adição de

sacarose reduziu o dano acrossomal durante o período de equilíbrio a 5 °C e que monossacarídeos (principalmente a frutose e xilose) possibilitou um incremento na motilidade e após a descongelação uma maior viabilidade e porcentagem de acrossomas intactos.

## **Experimento 2**

Após a diluição, a redução severa na motilidade provocada pela inclusão isoladamente de DSS ao diluidor ACP-106<sup>®</sup> foi um resultado esperado, uma vez que conhecidamente essa substância apresenta efeito espermicida na ausência da gema de ovo (ROTA et al., 1997; PEÑA et al., 2003). Este efeito espermicida seria atribuído à capacidade do DSS de solubilizar completamente membranas biológicas como a membrana plasmática do espermatozóide (PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000; ROTA et al., 2001). O efeito deletério da inclusão de DSS na ausência de gema de ovo foi observado também no vigor, morfologia espermática e funcionalidade de membrana.

O incremento na motilidade e vigor pela adição da gema de ovo, adicionada ou não de 0,25% de DSS, observado do primeiro ao terceiro dia de resfriamento, assim como no primeiro experimento, foi demonstrado previamente por Iguer-Ouada & Verstegen (2001). A partir do quarto dia, a inclusão de gema e DSS ao diluidor ACP-106<sup>®</sup> não possibilitou uma motilidade e vigor significativamente superiores a não inclusão de aditivos. Este fato poderia estar associado a danos provocados pela exposição prolongada aos efeitos do DSS como sugerido por Peña & Linde-Forsberg (2000).

Excetuando-se a inclusão de DSS isoladamente, a morfologia espermática foi bem preservada pelo diluidor ACP-106<sup>®</sup> contendo ou não aditivos na maioria dos tempos de avaliação. Apenas foi observado um efeito benéfico da adição de gema e DSS no terceiro dia e no quarto dia apenas em comparação ao diluidor ACP-106<sup>®</sup> sem aditivos. Assim como no primeiro experimento, o percentual de esteve acima de 70% espermatozoides morfolologicamente normais. Este valor, segundo descrito por Oettlé (1993), não afeta negativamente a fertilidade.

Assim como observado no primeiro experimento, a inclusão de gema de ovo ao diluidor ACP-106<sup>®</sup> provocou acidificação no meio de conservação. No entanto, a redução no pH só foi considerada estatisticamente significativa após 24 horas de resfriamento. Assim como no experimento anterior, não foi possível identificar com precisão o fator que provocou a acidificação no meio diluidor.

Em relação ao percentual de membranas funcionais, durante todo o período de resfriamento foi observado um efeito protetor da adição de gema de ovo sem DSS em comparação a ausência de aditivos. Este é um resultado esperado uma vez que já é amplamente conhecido o efeito protetor da gema de ovo, e já foi descrito anteriormente por diversos autores (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

A morfologia acrossomal foi melhor protegida pela adição de gema de ovo do segundo ao quarto dia de resfriamento, neste mesmo período, a adição de gema e DSS apresentou resultado semelhante à ausência de aditivos. Apesar do efeito benéfico da inclusão de DSS na presença de gema de ovo já ter sido descrito anteriormente para a criopreservação do sêmen canino (PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000). Neste trabalho, não foi observado uma melhor conservação da qualidade do sêmen canino pelo DSS associado à gema de ovo quando comparada à inclusão da gema isoladamente. A qualidade do sêmen poderia ter sido reduzida pela exposição prolongada ao DSS, pois, segundo Peña e colaboradores (2003), o efeito protetor do DSS é mais pronunciado quando o espermatozóide é exposto a esse componente imediatamente antes da congelação quando comparado com a exposição durante o período de equilíbrio. Estes mesmos autores sugerem que a exposição prolongada ao DSS poderia exercer um efeito deletério direto sobre as membranas por promover uma fluidez excessiva. Rota et al. (2001) utilizando DSS puro na concentração de 0,25%, observaram uma baixa longevidade após a descongelação, a qual foi atribuída à concentração utilizada que não foi considerada ideal, sugerindo que o DSS em excesso poderia dissolver as membranas celulares.

No presente trabalho, foi utilizado o DSS puro, que foi diluído em ACP-106<sup>®</sup> respeitando-se uma diluição de 0,25% (p/v). Outra forma que o DSS pode ser encontrado é no Equex STM ou Equex Pasta, que são formulações comerciais apresentadas na forma de pasta. Segundo Peña et al. (2003), existe uma diferença na qualidade do sêmen criopreservado de acordo com a apresentação de DSS utilizada, onde o uso de DSS na apresentação comercial Equex STM resulta em melhor sobrevivência e longevidade do sêmen canino descongelado em comparação ao DSS puro.

Nos experimentos um e dois foi incluído um grupo onde o diluidor ACP-106<sup>®</sup> não recebeu adição de gema de ovo. Foi observado um resultado discrepante, pois no primeiro experimento, o grupo sem gema de ovo não diferiu dos demais grupos quanto à qualidade do sêmen na maior parte do período de observação. Já no segundo experimento, a inclusão de gema de ovo apresentou um efeito benéfico, o qual está de acordo com o relatado na literatura consultada (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001). Essa discrepância poderia ser

atribuída às possíveis alterações na composição do diluidor ACP-106<sup>®</sup>, pois foram empregados lotes diferentes nos dois experimentos, estando o lote utilizado no primeiro armazenado por um período superior a três meses antes do início do mesmo, o que não ocorreu na segunda etapa do trabalho, onde o diluidor foi utilizado poucas semanas após sua fabricação. Outra possibilidade seria um possível efeito racial, pois no experimento um, foram utilizados cinco cães da raça Boxer e apenas três da raça American Pit Bull Terrier, já no segundo, foi utilizado o mesmo número de animais das duas raças.

## 9. CONCLUSÕES

---

O sêmen canino diluído em ACP-106<sup>®</sup> e resfriado a 4 °C pode ser eficientemente conservado por até três dias.

A exclusão da gema de ovo no diluidor ACP-106<sup>®</sup> reduz a qualidade do sêmen canino conservado a 4 °C por até cinco dias.

A inclusão de dodecil sulfato de sódio ao diluidor ACP-106<sup>®</sup> contendo 20% de gema de ovo não melhora a qualidade do sêmen canino resfriado a 4 °C e apresenta efeito deletério na ausência de gema de ovo.

## 10. PERSPECTIVA

---

---

A utilização de testes *in vivo* e/ou testes *in vitro* mais sofisticados no sêmen canino resfriado poderá auxiliar na escolha de uma concentração ótima de gema de ovo para o resfriamento do sêmen canino em ACP-106<sup>®</sup>.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABOAGLA, E. M. E; TERADA, T. Effects of supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezeability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, 62, p. 809-818, 2004.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3ª ed, Porto Alegre, Ed. Artes Médicas, 1294p, 1997.

ALTHOUSE, G. C.; KUSTER, C. E.; CLARK, S. G.; WEISIGER, R. M. Field investigationn of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, 53, p.1167-1176, 2000.

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 spermatozoal motility. **Theriogenology**, 33, p.147-157, 1990.

BOUSSEAU. S.; BRILLARD, J. P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, B.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, 50, p.699-706, 1998

BRAZ, V. B.; ARAUJO, A. A.; NUNES, J. F.; MACHADO, V. P.; MOURA, A. A. A.; OLIVEIRA, K. P. L. Viabilidade do sêmen ovino em água de coco em pó. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 27 (3), p. 328-329, 2003.

BWANGA, C.O. Cryopreservation of boar semen. In: A literature Review. **Acta Vet. Scand.**, 32, p. 431 – 453, 1991.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R. ; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Congelação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. **Ciência Animal**, v. 10, p. 29-36, 2000.

CARDOSO, R. C. S. Características *in vitro* do espermatozóide canino criopreservado em água de coco. 196p. **Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Ceará**, Fortaleza. 2005.

**CBRA**. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.

CARNEIRO, R. D.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; CARDOSO, J. F. S.; UCHOA, D. C.; TAVERNEZI, L.; ACKERMANN, C. L.; BRILHANTE, D. F. M., SILVA, L. D. M. Conservação do sêmen canino a 5 °C utilizando-se diluidores à base de água de coco *in natura* e em pó (ACP® 106). **XIV Encontro de Iniciação Científica**, In. Anais da X Semana Universitária da UECE. Fortaleza , 2005.

CHANTLER E, ABRAHAM-PESKIR JV, LITTLE S, MCCANN C, MEDENWALDT R. Effect of Cooling on the Motility and Function of Human Spermatozoa. **Cryobiology** , v. 41, p. 125–134, 2000.

CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**. Editora Manole, 363p, 1988.

CONCANNON, P.W. & BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: **Current Veterinary Therapy X**, p. 1247-1259, 1989.

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

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

FARSTAD, W. Semen Criopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, 42, p. 251 – 260, 1996.

FONTENELE, P. S.; CARDOSO, J. F. S; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Conservação a 5°C do sêmen canino diluído em água de coco. **Ciência Animal**, 12 (1), p. 153-156, 2002.

GUIMARÃES, M.A.B.V. Aplicação de técnicas de reprodução assistida em animais silvestres mantidos em cativeiro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 25 (2), p.116-117, 2001.

HAFEZ, E. S. E., **Reprodução Animal**, 6<sup>a</sup> ed, São Paulo, Ed. Manole, 582p, 1995.

IGUER-OUADA. M. Procréation Médicalement Assistée dans l'Espèce Canine: Analyse et Préservation à 4 °C du sperm. **Tese (Doutorado) – Université de Liège/Faculte de Médecine Vétérinaire**, Liège, Bélgica, 2000-2001.

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

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PERZ-PALAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, 70, p. 219-225, 1984.

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

KING, K; CHAN, P. J.; PATTON, W. C.; KING, A. Antibiotics: effect on cryopreserved-thawed human sperm motility in vitro. **Fertility and Sterility**, 67 (6), p. 1146-1151, 1997.

LINDE – FORSBERG, C., FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**39, p.299- 310. 1989.

LINDE-FORSBERG, C. & FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs, **J. Reprod. Fert.**, 47, p. 313-323, 1993.

MADEIRA, V. L. H.; CARDOSO, J. F. S.; SILVA, A. R.; UCHOA, D. C.; CARDOSO, R. C. S.; OLIVEIRA, C. M.; L. D. M. Uso da água de coco em pó (ACP®) como diluidor para conservação do sêmen de cães a 4 °C. In: **XIII Encontro de Iniciação Científica**, In. Anais da IX Semana Universitária da UECE. Fortaleza , 2004.

MARTIN, C. E. G. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides eqüinos criopreservados. 26p. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas. 2005.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, 57, p. 327-344, 2002.

MILITÃO, S. F.; POSSO, C. S.; SOUZA, F. M. 1994. Avaliação de diluidores alternativos para inseminação artificial em capotes (*Numida meleagris*). In: **XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Olinda-Pernambuco, p. 534, 1994.

MOURA, C. S. Utilização de diferentes diluentes na criopreservação do sêmen de cão. 2000. 40p. **Monografia (Graduação em Medicina Veterinária)** - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MOUSSA. M.; MERTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, M.; ANTON, M. Low density lipoproteins extract from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, 57, p.1695 -1706, 2002.

NUNES, J. F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. **Ciência Animal**, 7, p. 62-69, 1995.

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: **Simpósio de Biotecnologia da Reprodução de Animais Domésticos**, Fortaleza-Ceará, 1, p. 53-63, 1995.

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

PEÑA, A. I. Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity. 86p. **Tese (Doutorado) - Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala. 2000.**

PEÑA, A., LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, 54, p. 859–875, 2000.

PEÑA, A. I., LUGILDE, L. L., BARRIO, M., HERRADÓN, P. G., QUINTELA, L. A. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**, 59, p. 1725–1739, 2003.

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

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, p. 1498-1517, 2004.

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

RODRIGUES, B. A. Demanda de reprodução assistida em clínicas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 25 (2), p.112-115, 2001.

ROTA, A.; FRISHLING, A.; VANNOZZI, I.; CAMILLO, F.; ROMAGNOLI, S. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement.**, v.57, p.377-381, 2001.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. **Theriogenology**, 44, p. 885-900, 1995.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, 47, p. 1093-1101, 1997.

SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.; OLIVEIRA, K. P. L.; VIEIRA, V. E.; GONDIM, J. M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes a base de água de coco “*in natura*” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Supl n.5, p. 96-98, 2002.

SAMPAIO NETO, J. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J. F. Utilização do diluente ACP-105<sup>®</sup> na refrigeração do sêmen equino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Supl n.5, p.137-139, 2002.

SILVA, L.D.M. 1999. Tecnologia do sêmen canino. In: **Simpósio Cearense de Ciência Animal**, 1, p. 43-49.1999.

SOUSA, N. M., TEIXEIRA, M. D. A., OLIVEIRA, L. F. Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidor do sêmen ovino. In: **XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 1994, Olinda-Pernambuco, p. 583, 1994.

SPITTALER P. J.; TYLER J. P. P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity of spermatozoal membrane. **Clin Reprod Fertil**, v.3, p.187-190, 1985.

TONIOLLI, R.; FIÚZA, R. F.; JATAHY, P. C.; BARROS, D. Q.; SANTOS, B. S. Efeito do uso de diferentes antibióticos no controle bacteriano do ejaculado do varrão. **Ciência Animal**, 11 (1), p. 39-45, 2001.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D. S. M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 14, p. 249-254, 1990.

TSUTSUI, T.; HASE, M.; HORI, T.; ITO, T.; KAWAKAMI, E. Effects of Orvus ES Paste on Canine Spermatozoal Longevity after Freezing and Thawing. **J. Vet. Med. Sci.**, 62 (5), p. 533–535, 2000.

UCHOA, D. C. Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluidores à base de água de coco. 61p. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará**, Fortaleza. 2004.

VARELLA JR., A. S., LUCIA, T., CORRÊA, M. N., ALVARENGA, M. V. F., BIANCHI, I., ULGUIM, R. R., ROSA, A. P., CORCINI, C. D., DESCHAMPS, J. C. Effect of low density lipoproteins from hen egg yolk on the quality of canine semen cooled at 5 °C. **In. Proc. 15th Int. Cong. Anim. Reprod.** Brazil, p.514, 2004.

VARNER, D. D.; SCANLAN, M. C.; THOMPSON, J. A.; BRUMBAUGH, G. W.; BLANCHARD, T. L.; CARLTON, C. M.; JOHNSON, L. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**, 50, p. 559-573, 1998.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling, **Proceedings, 1st. Int. Conf. On Deep Freezing of Boar Semen**, p. 113 – 127, 1985.

YILDIZ C.; KAYA A.; AKSOY M.; TEKELI T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, 54, p. 579-585, 2000.

## 12. ANEXOS

---

---

Artigo submetido ao periódico Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.

**Influência da concentração de gema de ovo na qualidade do sêmen canino resfriado em  
ACP<sup>2</sup> -106**

*(Influence of egg yolk concentrations on the quality of the canine semen chilled in ACP<sup>2</sup> -106)*

## **Influência da concentração de gema de ovo na qualidade do sêmen canino resfriado em ACP<sup>2</sup> -106**

*(Influence of egg yolk concentrations on the quality of the canine semen chilled in ACP<sup>2</sup> -106)*

Janaina de Fátima Saraiva Cardoso\*; Ney Rômulo de Oliveira Paula; Daniel Couto Uchoa; Lúcia Daniel Machado da Silva

Laboratório de Reprodução de Carnívoros – FAVET, UECE

Av. Paranjana 1700, Itaperi, 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brasil

Tel.: 85 31019854, Fax: 85 31019840

\*email: janainadefatima@hotmail.com

### Resumo

Ejaculados de cães (n=10) foram diluídos e resfriados em ACP<sup>2</sup> -106 contendo 0, 5, 10 ou 20% de gema de ovo. Após 1d de resfriamento, a motilidade no grupo 20% foi superior a dos grupos 0% e 5%. Os grupos 10 e 20% melhor conservaram a morfologia acrossomal que 0%. Após 1d, houve uma redução do pH nos grupos 5, 10 e 20%. Diante do exposto, conclui-se que a inclusão de gema de ovo influencia a manutenção do pH no diluidor ACP-106 e que as concentrações 0, 10 ou 20% são eficientes para a conservação do sêmen canino por até 4d.

Palavras-chaves: cão, sêmen, resfriamento, água de coco

### Abstract

Ejaculated of dogs (n=10) were diluted and chilled in ACP -106 containing 0, 5, 10 or 20% of egg yolk. After 1d of chilling, the mobility in the group 20% was superior to groups 0% and 5%. The groups 10 and 20% best conserved the acrossomal morphology then 0%. After 1d, there was a reduction of pH in groups 5, 10 and 20%. In conclusion, the egg yolk influences the maintenance of the pH in the extender ACP-106 and that the concentrations 0, 10 or 20% are efficient for the conservation of the canine semen for up to 4d.

Keywords: dog, semen, chilling, coconut water

### Introdução

O sêmen diluído e resfriado foi utilizado com sucesso para o cão pela primeira vez em 1954 por Harrop (Bouchard et al., 1990), mas somente nos últimos anos, a utilização do sêmen resfriado para inseminação artificial em cães vem se tornando mais popular (Rota et al., 1995).

Existem principalmente duas opções para o transporte do sêmen por longa distância, o qual pode ser diluído, resfriado e estocado a 5 °C antes de ser reaquecido e utilizado, ou congelado e conservado por tempo indeterminado a -196 °C (England & Ponzio, 1996). O resfriamento consiste na preservação dos gametas sem atingir o ponto de congelamento o qual induz a mudanças intracelulares deletérias que afetam a viabilidade e o potencial fertilizante do espermatozóide (Iguer-Ouada, 2001).

Diversos diluidores foram utilizados para o resfriamento do sêmen canino como: Fresh-phos, Biladyl, EDTA, Tris-frutose, Tris-glicose, Tris-BES (Iguer-Ouada & Verstegen, 2001), leite desnatado, plasma seminal autólogo (Rota et al., 1995) e o diluidor à base de água de coco (Fontenele et al., 2002).

A água de coco, proveniente do fruto *Cocos nucifera*, é uma solução estéril, ligeiramente ácida, contendo proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento (fitormônios) e poucos fosfolipídios (Nunes, 1995), sendo estas, características que a classifica como um bom diluidor para o sêmen.

O diluidor à base de água de coco foi desenvolvido inicialmente para utilização no sêmen caprino, mas já foi utilizado com bastante sucesso para a diluição do sêmen de ovinos (Sousa et al., 1994), suínos (Tonioli et al., 1990), capotes (*Numida meleagris* - Militão et al., 1994), eqüinos (Sampaio Neto et al., 2002) e caninos (Cardoso et al., 2003). Com relação ao sêmen canino, foram realizados trabalhos de avaliação *in vitro* do sêmen congelado (Cardoso et al., 2003) e inseminação artificial com sêmen fresco (Pereira et al., 2001; Uchoa et al., 2002) obtendo-se bons resultados. Recentemente foi desenvolvido um diluidor à base de água de coco na forma de pó, sendo então denominado ACP<sup>®</sup>-106 o diluidor para uso no sêmen canino.

Um componente largamente utilizado na composição dos diluidores de sêmen é a gema de ovo, a qual foi atribuída propriedades nutritivas e protetoras de membrana contra o choque térmico (England, 1993; Moussa et al., 2002). Diversos autores têm sugerido que a fração de baixa densidade da gema de ovo, principalmente composta por lipoproteínas de baixa densidade (LDL), poderia ser basicamente responsável pela resistência ao choque térmico e melhoria na motilidade (Moussa et al., 2002). Estes mesmos autores relataram que as lipoproteínas de baixa densidade poderiam aderir à superfície da membrana celular restaurando a perda de fosfolipídeos e aparentemente induzindo a uma alteração transitória de sua composição, conseqüentemente prevenindo a ruptura da membrana plasmática (Farstard, 1996).

Embora a gema de ovo seja um importante componente dos diluidores comumente empregado para o resfriamento do sêmen canino, diversos autores recomendam apenas o empregado de 20% de gema de ovo independente de composição do diluidor utilizado (Iguer-Ouada & Verstegen, 2001; Rota et al., 1995). Desse modo, não tem sido investigada a influência da inclusão de gema de ovo em valores percentuais inferiores a 20% sobre a qualidade do sêmen canino resfriado. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi comparar diferentes concentrações de gema de ovo para o resfriamento a 5 °C do sêmen canino diluído em ACP<sup>®</sup>-106.

## Material e métodos

Foram utilizados oito cães das raças American Pit Bull Terrier (n=3) e Boxer (n=5), oriundos de canis particulares, clinicamente sadios e de fertilidade comprovada. Os cães receberam alimentação à base de ração comercial peletizada e tiveram acesso à água ad libitum. Foram utilizados no experimento apenas ejaculados que apresentassem motilidade superior a 70 %, vigor = 3, e menos de 15 % de espermatozóides com alterações morfológicas.

O diluidor ACP<sup>®</sup>-106 (ACP Biotecnologia®, Fortaleza-Ceará, Brasil) foi preparado segundo as recomendações do fabricante, acrescido de sulfato de diidroestrestomicina (1mg/mL) e benzilpenicilina sódica (1500 UI/mL) e apresentou pH de 6,8 e osmolaridade de 300 mOsm/L. O diluidor foi dividido em quatro alíquotas que receberam suplementação de gema de ovo a uma concentração final (v/v) de 0, 5, 10 e 20%

consistindo nas quatro concentrações testadas. Após o preparo, os diluidores foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos e utilizado o sobrenadante.

O sêmen foi coletado de acordo com a disponibilidade dos animais, através da técnica de manipulação digital do bulbo peniano (Christiansen, 1988) com o auxílio de um funil de plástico e tubos graduados. A segunda fração do ejaculado, rica em espermatozoides, foi retida para fins de avaliação e posterior resfriamento.

Logo após a coleta, foi realizada avaliação dos parâmetros físicos e microscópicos do sêmen e, em seguida, foi realizada a separação em alíquotas de igual volume que foram diluídas na proporção adequada para que atingissem uma concentração final de  $1 \times 10^8$  spz/mL e realizada nova avaliação dos parâmetros microscópicos. As mesmas foram acondicionadas numa caixa térmica contendo gelo reciclável (10 °C) por 60 minutos, iniciando-se o resfriamento e, posteriormente, foram transferidas para um refrigerador a 4 °C.

O sêmen coletado foi avaliado física e microscopicamente. As avaliações físicas incluíram: cor, viscosidade, volume e pH através de fitas indicadoras (pH-Fix 0-14, Macherey-Nagel®). Já as análises microscópicas incluíram: motilidade, vigor, concentração espermática, funcionalidade de membrana, morfologia espermática e acrossomal. A avaliação da motilidade e do vigor foi realizada subjetivamente com auxílio da microscopia óptica, com aumento de 100 x, onde a motilidade foi expressa em percentual de espermatozoides móveis e o vigor em uma escala de 0 a 5 (Christiansen, 1988). A concentração espermática foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer (Cbra, 1998).

Para a avaliação da morfologia espermática e acrossomal, foram utilizados esfregaços corados com rosa de bengala, sendo contadas 200 células por lâmina em microscópio de contraste de fase (1000 x). Na avaliação morfológica, os espermatozoides foram classificados como normais ou apresentando alterações primárias ou secundárias (Christiansen, 1988). Os acrosomas foram classificados como normais, destacados, ausentes, vesiculados, edemaciados ou com distribuição anormal (Oettlé, 1993).

A avaliação da funcionalidade da membrana espermática foi realizada pelo teste hiposmótico (Jeyendran et al., 1984) no sêmen fresco e resfriado. Foi utilizada uma solução hiposmótica (150 mOsmol) constituída de citrato de sódio (7,35 g), frutose (13,51 g) e água destilada autoclavada (1000 mL). Uma alíquota de 0,1 mL de sêmen foi diluída em 0,9 mL da solução hiposmótica e levada ao banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após o término do período de incubação, uma alíquota foi colocada em lâmina, coberta com lamínula, e avaliada em microscópio óptico no aumento de 400x. Foram contadas 200 células e do total de espermatozoides com cauda enrolada foi subtraído o número de espermatozoides que apresentaram a mesma alteração na avaliação morfológica em esfregaços corados. Os espermatozoides com enrolamento de cauda indicativo de edema de cauda foram considerados como apresentado membrana funcional.

As amostras de sêmen foram avaliadas fisicamente e microscopicamente, como descrito anteriormente, após a diluição e a cada 24 horas até que não fossem mais observado espermatozoides móveis.

Os dados de cor e viscosidade da segunda fração do sêmen foram descritos de forma subjetiva. Os demais parâmetros foram expressos na forma de média e desvio padrão e analisados pelo software Statview 5.0 software (SAS Institute Inc., 1998). As diferenças entre os cães no que se refere às características do sêmen fresco foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Para a motilidade, morfologia e funcionalidade de membrana foi empregada a transformação angular. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade KS. Com a finalidade de comparar os grupos, foi empregado o teste t de Student ( $P < 0,05$ ) para os parâmetros de motilidade, porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais, membranas funcionais, acrossomas

íntegros e pH. Para o vigor, foi utilizado o teste de Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ). Cada tratamento foi realizado em dez replicatas. Para efeito de comparação entre os grupos foram consideradas as diferenças estatísticas até o quinto dia de resfriamento onde ainda permanecia móvel um mínimo de cinco replicatas em pelo menos um grupo.

## Resultados

O sêmen fresco apresentou cor branca opalescente e viscosidade leitosa. Os valores espermáticos de motilidade, vigor, concentração e morfologia estão apresentados na Tab. 1. A análise estatística demonstrou que os animais experimentais representaram uma população homogênea, uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre eles ( $P > 0,05$ ).

A motilidade espermática foi semelhante entre os grupos, exceto após um dia de resfriamento onde o grupo contendo 20% ( $90,0 \pm 6,13\%$ ) de gema de ovo foi superior aos grupos contendo 0% ( $70 \pm 26,7\%$ ) e 5% ( $75,5 \pm 16,4\%$ ) (Fig. 1). O vigor diferiu entre os grupos apenas um dia após o resfriamento. Neste mesmo período, o grupo 20% foi superior apenas ao grupo que continha 5% de gema de ovo (Fig. 2).

Tabela 1. Média e desvio padrão das características dos dez ejaculados frescos dos animais experimentais

Parâmetro	Média $\pm$ dp
Volume (mL)	$1,22 \pm 0,58$
Motilidade (%)	$98,5 \pm 2,4$
Vigor (0-5)	$5 \pm 0$
Espermatozóides morfologicamente normais (%)	$92,1 \pm 4,41$
Espermatozóides com membrana funcional (%)	$91,25 \pm 5,50$
Acrossomas normais (%)	$97,9 \pm 2,42$
Concentração espermática ( $\times 10^6$ spz/mL)	$687 \pm 292,54$
pH	$7 \pm 0$

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os cães ( $P > 0,05$ ; teste de Kruskal-Wallis).

A morfologia espermática foi melhor protegida no dia dois pela concentração de 5% de gema de ovo, quando comparada com a concentração de 20%, como também no dia quatro em comparação com o grupo 0% (Tab. 2).

A principal diferença entre os grupos foi em relação ao pH. Após o resfriamento, foi observada uma redução do pH nos diluidores que continham gema de ovo (Tab. 3). Nos dias três e cinco de resfriamento, essa redução foi significativa no pH dos grupos que continham 5, 10 e 20% de gema de ovo. O grupo 0% apresentou pH superior ao do grupo 20% no dia dois. Apenas no dia quatro, o grupo 5% apresentou pH superior ao do grupo 20% de gema de ovo.

Tabela 2. Porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais (média  $\pm$  dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP<sup>®</sup>-106 contendo diferentes concentrações de gema de ovo.

Dias	Concentração de gema de ovo
------	-----------------------------

	0%	5%	10%	20%
Dil	91,05 ± 3,99a	93,15 ± 2,24a	91,75 ± 6,02a	92,55 ± 3,76a
1	83,9 ± 6,12a	88,7 ± 5,77a	87,35 ± 6,36a	85,5 ± 6,24a
2	83,72 ± 7,03ab	87,4 ± 6,60a	85 ± 6,31ab	82,3 ± 3,95b
3	79,89 ± 9,82a	86 ± 3,92a	83,88 ± 5,87a	82,11 ± 6,01a
4	81,67 ± 9,19a	83,2 ± 7,60b	84,71 ± 7,30ab	82,57 ± 6,78ab
5	80,11 ± 10,04a	81,67 ± 4,04a	77 ± 7,11a	80,29 ± 11,67a

a,b: Letras diferentes na mesma linha P<0,05.

Tabela 3. Valores de pH (média ± dp) do sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP<sup>®</sup>-106 contendo diferentes concentrações de gema de ovo.

Dias	Concentração de gema de ovo			
	0%	5%	10%	20%
Dil	7 ± 0a	7 ± 0a	7 ± 0a	7 ± 0a
1	7 ± 0a	7 ± 0a	7 ± 0a	6,8 ± 0,42a
2	7 ± 0a	6,8 ± 0,42ab	6,7 ± 0,48ab	6,4 ± 0,52b
3	7 ± 0a	6,5 ± 0,53b	6,44 ± 0,53b	6,1 ± 0,32b
4	7 ± 0a	6,5 ± 0,55b	6,17 ± 0,41bc	6 ± 0ac
5	6,89 ± 0,34a	6 ± 0b	6 ± 0b	6 ± 0b

a, b,c: Letras diferentes na mesma linha P<0,05.

Após o resfriamento, foi observada uma redução no percentual de espermatozoides com membranas funcionais (Tab. 4). No dia quatro, a ausência de gema de ovo no diluidor melhor protegeu a integridade funcional de membrana apenas em relação ao diluidor que continha 5% de gema de ovo.

Tabela 4. Porcentagem de espermatozoides apresentando membranas funcionais (média ± dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP<sup>®</sup>-106 contendo diferentes concentrações de gema de ovo.

Dias	Concentração de gema de ovo			
	0%	5%	10%	20%
Dil	86,85 ± 7,24a	89,8 ± 6,32a	90,75 ± 2,99a	90,6 ± 4,38a
1	75,4 ± 9,78a	78,35 ± 13,13a	82,15 ± 10,05a	79,15 ± 9,32a
2	71,65 ± 9,67a	75,95 ± 13,83a	79,6 ± 10,71a	72,1 ± 12,73a
3	71,33 ± 9,90a	67 ± 10,17a	69,13 ± 16,05a	72,56 ± 8,79a
4	64,78 ± 12,36a	63,5 ± 7,65b	63,93 ± 15,40ab	66,93 ± 15,69ab
5	61,89 ± 6,47a	52,6 ± 12,29a	64,83 ± 10,97a	60,43 ± 26,80a

a, b: Letras diferentes na mesma linha P<0,05.

Em relação à morfologia acrossomal, os diluidores que continham 10 e 20% de gema de ovo possibilitaram uma melhor conservação em comparação ao diluidor sem gema de ovo um dia após o início do

resfriamento (Tab. 5). Nos demais dias, os diluidores conservaram de maneira semelhante a morfologia acrossomal.

Tabela 5. Porcentagem de espermatozoides apresentando acrossomas morfologicamente normais (média  $\pm$  dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP<sup>®</sup>-106 contendo diferentes concentrações de gema de ovo.

Dias	Concentração de gema de ovo			
	0%	5%	10%	20%
Dil	97,2 $\pm$ 1,48a	97 $\pm$ 1,25a	96 $\pm$ 1,41a	95,8 $\pm$ 2,044a
1	87,1 $\pm$ 6,87a	92 $\pm$ 4,47ab	90,1 $\pm$ 5,61b	90,3 $\pm$ 4,24b
2	85,67 $\pm$ 6,847a	84,4 $\pm$ 7,62a	86,3 $\pm$ 7,15a	85,6 $\pm$ 6,10a
3	85 $\pm$ 6,32a	85 $\pm$ 6,80a	83,13 $\pm$ 9,45a	84,11 $\pm$ 7,62a
4	83,22 $\pm$ 10,65a	76,6 $\pm$ 11,35a	84,29 $\pm$ 9,45a	80,29 $\pm$ 8,69a
5	83,89 $\pm$ 10,71a	81 $\pm$ 5a	73 $\pm$ 18,52a	80 $\pm$ 12,45a

a,b: Letras diferentes na mesma linha P<0,05.

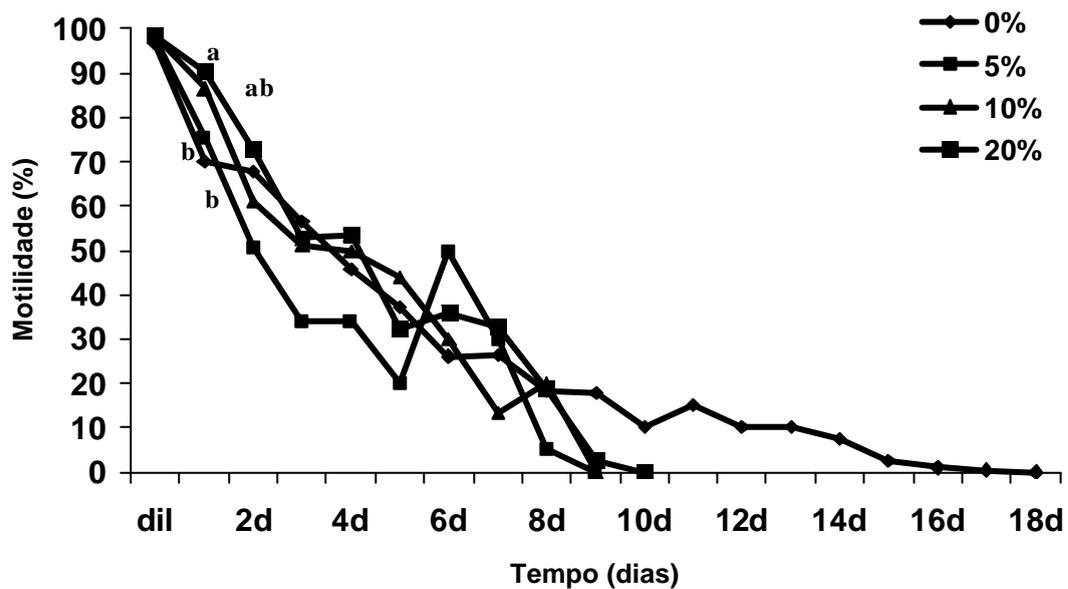


Figura 1. Motilidade do sêmen canino após a diluição (dil) em ACP<sup>®</sup>-106 contendo diferentes concentrações de gema de ovo e resfriamento a 5 °C.

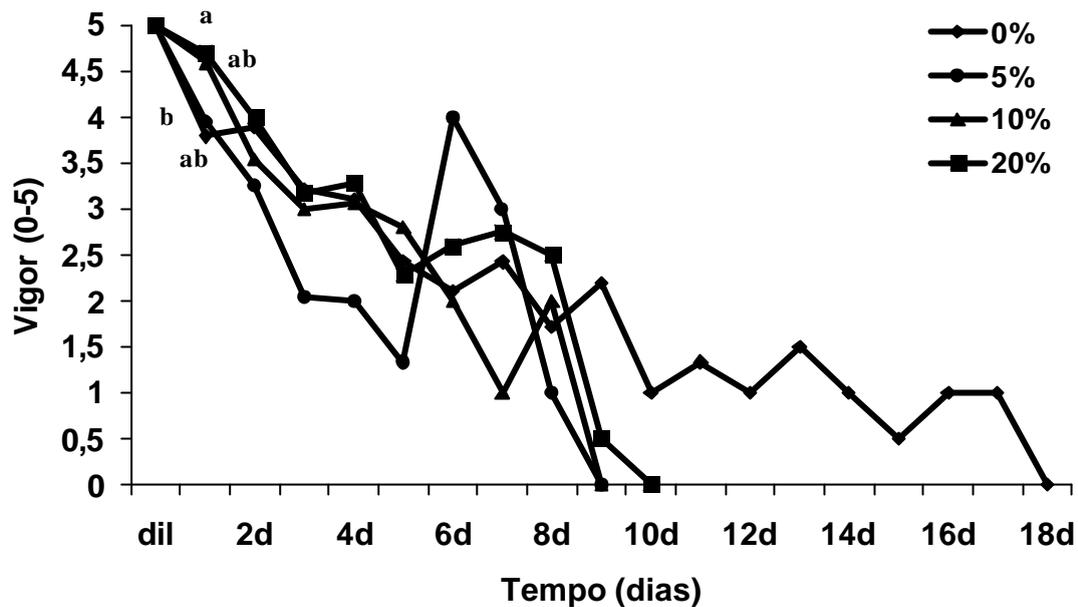


Figura 2. Vigor do sêmen canino após a diluição (dil) em ACP®-106 contendo diferentes concentrações de gema de ovo e resfriamento a 5 °C.

## Discussão

O resfriamento do sêmen tem se tornado uma técnica de reprodução assistida em cães cada vez mais popular, uma vez que é possível transportar as amostras de sêmen rapidamente entre os locais de coleta e inseminação artificial. Além disso, o sêmen resfriado e posteriormente reaquecido parece ser menos prejudicado no processo de preservação visto que após inseminação artificial, a taxa de gestação aparenta ser mais alta que aquela atingida pelo sêmen congelado e descongelado (Linde-Forsberg & Forsberg, 1993). Segundo England & Ponzio (1996) a qualidade do sêmen resfriado é superior a do sêmen congelado/descongelado até dois dias de armazenamento, sendo este período considerado o tempo máximo necessário para o transporte do sêmen (Rota et al., 1995). Após aproximadamente 4,9 dias (110 horas) a qualidade do sêmen resfriado é inferior a do sêmen congelado/descongelado (England & Ponzio, 1996).

Os parâmetros encontrados no sêmen fresco estavam de acordo com a faixa de normalidade para a espécie canina (Oettlé, 1993; Johnston et al., 2001).

Após o resfriamento, foi observado um declínio progressivo na motilidade e no vigor. Segundo Chantler et al. (2000), esse fenômeno se deve à sensibilidade espermática à redução da temperatura, culminando no decréscimo progressivo de sua motilidade quando submetido ao resfriamento. Esse fenômeno tem sido atribuído à sensibilidade térmica da bomba sódio-potássio-ATPase e subsequente dispersão de íons (Ponglowhapan et al., 2004).

Após um dia de resfriamento, no grupo contendo 20% de gema de ovo, houve uma melhor conservação da motilidade quando comparada aos grupos contendo 0 e 5%. Esse efeito benéfico de gema de ovo na preservação de motilidade do espermatozóide canino foi demonstrado previamente por Iguer-Ouada &

Verstegen (2001). No mesmo tempo de avaliação, a inclusão de 10% de gema de ovo no diluidor resultou em motilidade semelhante à inclusão de 20%, porém a inclusão de 5% demonstrou ser insuficiente para a conservação da motilidade.

A morfologia espermática é um parâmetro indispensável na avaliação seminal, pois está intrinsecamente implicada em problemas na fertilidade, tanto na espécie canina, como em outras espécies animais (Oettlé, 1993). Oettlé (1993) relata que à medida que se aumenta o percentual de espermatozóides anormais, a fertilidade é reduzida, sendo que quando a proporção de espermatozóides morfológicamente normais está abaixo de 60%, a fertilidade é adversamente afetada.

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana espermática (Spittaler & Tyler, 1985), sendo essa importante para o metabolismo espermático. Essa análise é um teste de endosmose que determina as mudanças na membrana espermática, onde o transporte através dessa é um processo bioquímico importante para a viabilidade espermática e capacidade fertilizante (Jeyendran et al., 1984). A proteção observada pela ausência de gema de ovo no dia quatro pode indicar que a inclusão de 5% de gema de ovo foi suficiente para promover a alteração do pH e promover efeitos negativos conseqüentes, o que não foi observado nos grupos que continham 10 e 20% de gema de ovo, onde supõe-se que a proteção conferida pela gema de ovo foi superior aos efeitos indesejáveis promovidos pela acidificação do meio diluidor. Por outro lado, açúcares como a glicose, frutose e sacarose presentes na água de coco poderia ter conferido proteção ao espermatozóide. Yildiz et al. (2000), demonstraram para a criopreservação do sêmen canino que a suplementação com sacarose reduziu o dano acrossomal durante o período de equilíbrio a 5 °C e que monossacarídeos (principalmente a frutose e xilose) possibilitaram um incremento na motilidade e após a descongelação uma maior viabilidade e porcentagem de acrossomas intactos.

Em relação à morfologia acrossomal, houve um efeito protetor da inclusão de 10 ou 20% de gema de ovo, assim como observado para a motilidade. Iguer-Ouada & Verstegen (2001) demonstraram que a gema de ovo apresentava um efeito protetor sobre o acrossoma. Esse efeito refletiu-se em melhor conservação da integridade acrossomal e prevenção da ocorrência da reação acrossômica espontânea nos diluidores suplementados com 20% de gema de ovo.

Diante dos resultados, pode-se concluir que a inclusão de gema de ovo influencia a manutenção do pH no diluidor ACP-106 e que as concentrações de 0, 10 ou 20% de gema de ovo são eficientes para a conservação da qualidade do sêmen canino a 4 °C por até quatro dias.

### **Referências Bibliográficas**

BOUCHARD GF., MORRIS J.K., SIKES J.D., YOUNGQUIST RS. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, v. 3, p.147-157, 1990.

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.743-75, 2003

- CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.
- CHANTLER E., ABRAHAM-PESKIR J.V., LITTLE S., MCCANN C., MEDENWALDT R. Effect of Cooling on the Motility and Function of Human Spermatozoa. *Cryobiology*, v.41, p.125–134, 2000.
- CHRISTIANSEN I.J. *Reprodução no cão e no gato*. Editora Manole, 1988, 363p.
- ENGLAND G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review, *J Reprod. Fert.*, v.47, p.243-255, 1993.
- ENGLAND G.C.W., PONZIO P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen, *Theriogenology*, v.46, p.165-171, 1996.
- FARSTAD W. Semen Criopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, p.251 – 260, 1996.
- FONTENELE P.S., CARDOSO J.F.S., CARDOSO R.C.S., SILVA A.R., UCHOA D.C., SILVA L.D.M. Conservação a 5°C do sêmen canino diluído em água de coco. *Ciê. Animal*, v.12 (1), p.153-156, 2002.
- IGUER-OUADA M. *Procréation Médicalement Assistée dans l'Espèce Canine: Analyse et Préservation à 4 °C du sperm*. 2001. 220f. Tese (Doutorado) – Université de Liège, Liège.
- IGUER-OUADA M., VERSTEGEN J.P. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, v.55, p.671-684, 2001.
- JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., PERZ-PALAEZ M., CRABO B.G., ZANEVELD L.J.D. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, v.70, p.219-225, 1984.
- JOHNSTON S.D., KUSTRITZ M.V.R., OLSON P.N.S. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders. 2001. 592p.
- LINDE-FORSBERG C, FORSBERG M. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs, *J. Reprod. Fert.*, v.47, p.313-323, 1993.
- MILITÃO S.F., POSSO C.S., SOUZA F.M. Avaliação de diluidores alternativos para inseminação artificial em capotes (*Numida meleagris*). In: XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1994, Olinda-Pernambuco. *Anais...* Olinda, 1994. p. 534. Resumo.

MOUSSA M., MERTINET V., TRIMECHE A., TAINTURIER M., ANTON M. Low density lipoproteins extract from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695 -1706, 2002.

NUNES J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. *Ciê. Animal*, v.7, p.62-69, 1995.

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

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

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*, v.62, p.1498-1517, 2004.

ROTA A., STRÖM B., LINDE-FORSBERG C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology*, v.44, p.885-900, 1995.

SAMPAIO NETO J.C., SALGUEIRO C.C.M., MATEOS-REX E., NUNES J.F. Utilização do diluente ACP-105<sup>®</sup> na refrigeração do sêmen equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.5, p.137-139, 2002.

SOUSA N.M., TEIXEIRA M.D.A., OLIVEIRA L.F. Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidor do sêmen ovino. In: XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1994, Olinda-Pernambuco. *Anais...* Olinda, 1994. p. 583. Resumo.

SPITTALER P.J., TYLER J.P.P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity os spermatozoal membrane. *Clin Reprod Fertil*, v.3, p.187-190, 1985.

TONIOLLI R., MESQUITA D.S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.14, p.249-254, 1990.

UCHOA D.C., SILVA A.R., CARDOSO R.C.S., PEREIRA B.S., SILVA L.D.M. Conservação do sêmen canino a 37 °C em diluentes à base de água de coco. *Ciê. Rural*, v.32, p.91-95, 2002.

YILDIZ C., KAYA A., AKSOY M., TEKELI T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, v.54, p.579-585, 2000.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)