

CONSERVAÇÃO DO SÊMEN CANINO A 37°C EM DILUENTES À BASE DE ÁGUA DE COCO

CANINE SEMEN CONSERVATION AT 37°C IN COCONUT WATER BASED EXTENDERS

Daniel Couto Uchoa¹ Alexandre Rodrigues Silva² Rita de Cássia Soares Cardoso²
Bárbara Sucupira Pereira³ Lúcia Daniel Machado da Silva⁴

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar a eficiência do diluidor à base de água de coco acrescido de ácido 3-indol acético (AIA) e gema de ovo na conservação do sêmen canino a 37°C. Coletou-se o sêmen de seis cães adultos por manipulação digital, fracionando-o em três alíquotas. Procedeu-se a diluição do sêmen com o diluidor à base de água de coco (grupo A), com este acrescido de 4% de AIA (grupo B) e, com o mesmo acrescido de 20% de gema de ovo e 4%AIA (grupo C). Avaliou-se a motilidade, o vigor e a percentagem de alterações morfológicas espermáticas imediatamente após a coleta e periodicamente durante 180 minutos (T0, T5, T15, T30, T60, T90, T120, T180), avaliando-se também a taxa de degradação média de motilidade espermática (TDM). Os diluidores foram comparados pelo teste de Whitney-Mann ($P<0,05$). Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos até T60. A motilidade no uso do grupo A foi superior à dos demais grupos a partir de T90, ficando em torno de 95%. A TDM foi significativamente menor no diluente A (7,5%) em relação aos demais diluentes. Dessa forma, o diluente à base de água de coco mostrou-se adequado para a preservação do sêmen canino a 37°C por 180 minutos.

Palavras-chave: sêmen canino, termorresistência, água de coco.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the canine semen diluted with coconut water extender, added of 3-indol acetic acid (IAA) and egg yolk at 37°C. Sperm of six stud dogs was collected by digital manipulation and divided in three equal aliquots. Dilution was performed by the addition of coconut water (extender 1), coconut water plus 4% of IAA (extender 2) and coconut water plus 4% of IAA and 20% of egg yolk (extender 3). Sperm motility, vigor and morphology immediately after dilution and periodically until 180 minutes, as well as media degradation motility rate (DMR), were evaluated. Extenders were

compared by Whitney-Mann test ($P<0.05$). Statistical differences were not shown between the extenders up to 60 minutes. After 90 minutes, sperm motility on the extender A was superior to the other extenders (95%). The DMR on the extender A (7.5%) was significantly inferior to the other extenders. Thus, coconut water extender is adequate for the preservation of canine semen at 37°C for 180 minutes.

Key words: canine semen, termorresistance, coconut water.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma biotecnologia bastante difundida na reprodução assistida de diversas espécies. Atualmente, essa biotécnica vem tornando-se usual também entre os veterinários que trabalham com melhoramento genético de cães. Paralelamente ao uso da IA, diversos métodos de conservação de sêmen canino, como o resfriamento (YUBI *et al.*, 1987; ROTA *et al.*, 1995) e a congelamento (FOOTE, 1964; ENGLAND, 1993; RODRIGUES, 1997, SILVA *et al.*, 2000) estão sendo aperfeiçoados. Entretanto, a utilização do sêmen fresco dentro de um curto período de tempo após a coleta tem recebido pouca atenção, sendo necessária a realização de estudos que verifiquem a viabilidade espermática. Isso facilitaria o transporte do sêmen canino dentro e entre áreas geográficas separadas por pouca distância, possibilitando, inclusive, o seu fracionamento e a inseminação de diversas cadelas.

¹Acadêmico de Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Rua Jaime Pinheiro, 84, Cocó, Fortaleza, Ceará. E-mail: donpepe@zipmail.com.br. Autor para correspondência.

²Médico veterinário, Mestrando em Ciências Veterinárias, FAVET/UECE.

³Acadêmico de Medicina Veterinária, FAVET/UECE.

⁴Doutor em Ciências Veterinárias, FAVET/UECE.

A determinação da viabilidade espermática é realizada através do teste de termorresistência, que consiste na incubação do sêmen em banho-maria a 37°C na tentativa de se reproduzir *in vitro* o que aconteceria com os espermatozoides no interior do trato genital feminino. Neste teste, pode-se utilizar o sêmen fresco sem aditivos ou com a adição de diluentes. Nos últimos anos, foi desenvolvido um diluente à base de água de coco para a conservação do sêmen de caprinos (NUNES, 1985), suínos (TONIOLLI & MESQUITA, 1990), capotes (MILITÃO *et al.*, 1994) e ovinos (SOUZA *et al.*, 1994). O sêmen de suínos (TONIOLLI & MESQUITA 1990), e de caprinos e ovinos (NUNES & COMBARNOUS 1995), diluído em água de coco demonstrou excelentes resultados durante o teste de termorresistência, resfriamento e congelamento. No sêmen canino, apenas testes de congelamento com o referido diluidor foram efetuados, tendo sido alcançados excelentes resultados (SILVA *et al.*, 2000).

Devido à abundância de sua matéria-prima na região Nordeste do Brasil, refletindo-se em baixo custo, associado ao preparo simples, é viável a possibilidade de se adequar o diluente à base de água de coco à conservação do sêmen de cães. Foi isolada da água de coco uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol-acético (AIA), o qual confere aos espermatozoides, um aumento na motilidade e vigor espermático (SALES, 1989). Um outro componente largamente utilizado na composição de diluidores do sêmen canino é a gema de ovo pelas suas propriedades nutritivas e protetoras de membrana (ENGLAND, 1993). Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do diluidor à base de água de coco acrescido de ácido 3-Indol acético (AIA) e gema de ovo na conservação do sêmen canino a 37°C.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do trabalho, foram selecionados seis cães das raças: Pastor Alemão (n=2), Husky Siberiano (n=1), Rottweiler (n=1), Retriever Labrador (n=1) e sem raça definida (n=1), com idade variando entre 2 e 7 anos. Os animais, pertencentes ao canil da Polícia Militar do Ceará e a canis particulares, foram alimentados com ração comercial Pedigree® uma vez ao dia, tendo acesso à água à vontade.

Cada cão foi submetido a uma coleta de sêmen por manipulação digital (CHRISTHIANSEN,

1984), com o auxílio de funil e tubos graduados. O ejaculado foi avaliado e a fração espermática separada em três alíquotas destinadas à diluição e conservação com os três diluentes a serem testados.

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto às suas características macroscópicas (aspecto, volume, viscosidade e cor). Avaliou-se também a motilidade (percentagem de espermatozoides móveis) e o vigor espermático, qualificado em escala de 0 a 5 (HERMAN & SWANSON, 1941), através da microscopia ótica (100 e 400x). Para a análise morfológica dos espermatozoides, fez-se um esfregaço de sêmen corado com hematoxilina-eosina modificada, cujo procedimento consistia na imersão do esfregaço em álcool absoluto por 10 segundos, em hematoxilina por 10 segundos e, finalmente, em eosina por 15 segundos. Em seguida, a lâmina era lavada em água corrente para a retirada do excesso de corante. Por fim, fazia-se sua avaliação através da microscopia ótica (400x -PLATZ e SEAGER, 1977). A concentração espermática foi determinada através de espectrofotometria (CARDOSO *et al.*, 1997). Apenas as amostras de sêmen consideradas excelentes, ou seja, apresentando 100% de espermatozoides móveis com vigor 5,0 e uma porcentagem de alterações morfológicas espermáticas inferior a 20% foram utilizadas neste experimento.

Foram utilizados três diferentes diluentes cuja base foi uma solução composta em média por 50% de água de coco, 25% de água destilada e 25% de citrato de sódio a 5%, com osmolaridade ajustada entre 304 e 306 mOsm/l. Os diluentes foram agrupados da seguinte forma: diluente base (grupo A), diluente base acrescido de 4% de solução contendo 4ng de AIA/ml de etanol (grupo B), e grupo B acrescido de 20% de gema de ovo mais 4% de solução contendo 4ng de AIA/ml de etanol (grupo C). Para cada grupo, foram realizadas 6 repetições.

Logo após a análise da fração espermática de cada cão, essa foi dividida em três alíquotas iguais e diluída na proporção 1:1 com o diluente a ser estudado, sendo mantido em tubos graduados em banho-maria a 37°C. Foram realizadas análises microscópicas imediatamente após a diluição (T0) e aos 5, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Foi também avaliada a taxa de degradação média da motilidade (TDM) através da fórmula proposta por CORTEEL (1976):

$$TDM = \frac{\text{motilidade 5 minutos} - \text{motilidade 180 minutos}}{\text{motilidade 5 minutos}} \times 100$$

Os resultados deste experimento foram expressos na forma de média e desvio padrão. O efeito dos diferentes diluentes testados sobre a conservação dos parâmetros espermáticos foi analisado pelo Teste de Whitney-Mann, sendo as diferenças consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração espermática do sêmen fresco dos seis cães utilizados no experimento apresentou aspecto normal, volume médio de $1,82 \pm 0,71 \text{ml}$, coloração branca-opalescente, viscosidade leitosa e concentração média de $766 \times 10^6 \text{spz/ml}$. Tais características estão dentro da normalidade para a espécie canina (CHRISTHIANSEN, 1986).

O sêmen fresco apresentou uma motilidade próxima a 100%, vigor em torno de 5, com $8\% \pm 3,2$ de alterações totais. A motilidade espermática após diluição em todos os três diferentes diluentes avaliados no tempo 0 foi de 100% e, até 60 minutos, a motilidade espermática não diferiu entre os grupos ($P > 0,05$). Após 90 minutos, o grupo A apresentou uma motilidade de $95,8 \pm 6,7\%$, sendo significativamente superior aos grupos B e C, que apresentaram motilidade de $54,2 \pm 34,4\%$ e $60 \pm 35,8\%$, respectivamente, os quais não diferiram entre si (Figura 1). Imediatamente após a diluição, o vigor espermático, apresentou um valor 5 para todos os grupos, os quais não apresentaram diferenças estatísticas até os 90 minutos. A partir dos 120 minutos, observou-se que o grupo A preservou de maneira mais eficiente o vigor espermático, quando comparado ao grupo C (Figura 2).

Na avaliação do sêmen canino diluído somente em água de coco (grupo A) realizada após 120 minutos, foi observada uma motilidade espermática de 94%, com um vigor de 4,5, resultados estes próximos aos verificados no uso do mesmo diluidor para o teste de termorresistência do sêmen ovino, isto é, motilidade de 85%, com vigor de 4,5 (NUNES & COMBARNOUS, 1995).

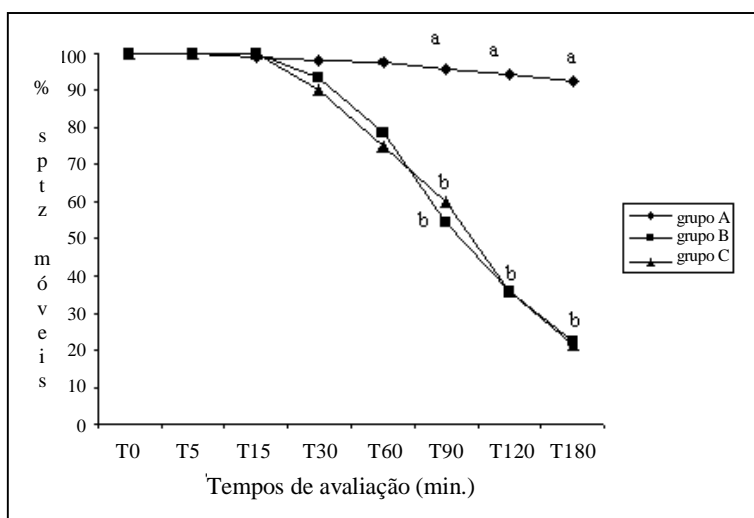


Figura 1 - Motilidade espermática observada durante o teste de termorresistência do sêmen canino a 37°C no uso do diluidor à base de água de coco (Grupo A), água de coco + AIA (Grupo B) e água de coco + gema + AIA (Grupo C). (Letras diferentes na Figura implicam diferenças entre os diluidores ($P < 0,05$)).

A utilização da água de coco acrescida de AIA a 37°C por 120 minutos para a diluição do sêmen caprino foi realizada por NUNES & SALES (1993), tendo sido observada uma motilidade espermática alta e constante durante os 30 minutos iniciais. A partir dos 60 minutos, observou-se queda acentuada do referido parâmetro espermático. No presente trabalho, a observação da constância da motilidade espermática no sêmen canino durante os

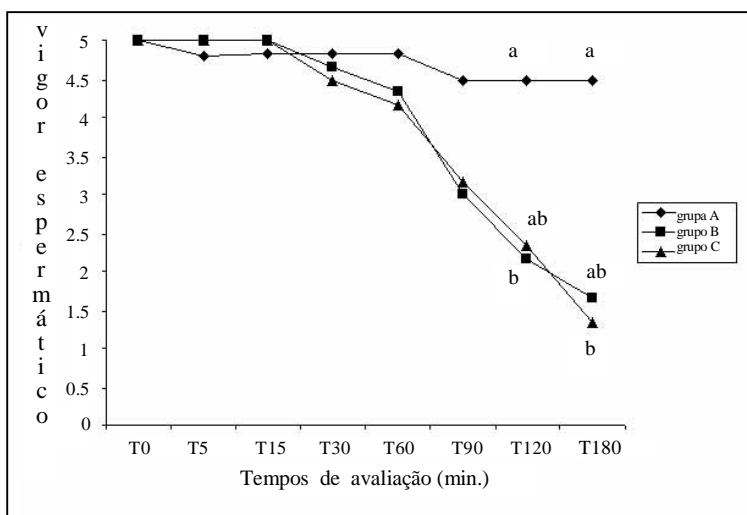


Figura 2 - Vigor espermático observado durante o teste de termorresistência do sêmen canino a 37°C no uso do diluidor à base de água de coco (Grupo A), água de coco + AIA (Grupo B) e água de coco + gema + AIA (Grupo C). (Pelo menos uma letra igual significa que não há diferença entre os grupos. ($P < 0,05$)).

15 minutos iniciais, e posterior declínio aos 30 minutos, mostrou certa similaridade com os resultados obtidos com o sêmen caprino. Possivelmente, em ambas as espécies, isso se deve ao aumento do metabolismo espermático promovido pelo AIA no início do teste de termorresistência, culminando com o final das reservas energéticas de frutose e exaurindo o espermatozoíde.

A tabela 1 mostra que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto ao parâmetro de porcentagem de alterações morfológicas totais no sêmen canino, observadas durante o teste de termorresistência. Entretanto, verificou-se que tal porcentagem de alterações sofreu um aumento no decorrer do tempo, dentro de cada grupo, atingindo valores de $28,0 \pm 7,2$ (grupo A), $22,8 \pm 7,7$ (grupo B) e $25,8 \pm 6,8$ (grupo C). Dentre tais alterações, as mais evidentes foram cabeças soltas e caudas enroladas, as quais se caracterizavam como alterações secundárias, oriundas da maturação espermática no epidídimo ou decorrentes do processamento do sêmen, o que envolve desde o seu acondicionamento até a confecção do esfregaço (PLATZ & SEAGER, 1977).

A taxa de degradação da motilidade (TDM) ao final de 180 minutos verificada no grupo A foi de 7,5% sendo significativamente inferior ($p < 0,05$) àquela dos grupos B e C que foram de 77,5% e 78,3%, respectivamente, não diferindo entre si (Tabela 2).

Após 120 minutos, CORTEEL (1976) verificou uma TDM entre 50 e 60% utilizando a

Tabela 1 - Porcentagem de alterações morfológicas espermáticas verificadas no teste de termorresistência do sêmen canino a 37°C no uso do diluidor à base de água de coco (Grupo A), água de coco + AIA (Grupo B), água de coco + gema + AIA (Grupo C).

Tempo (min.)	Grupo		
	A	B	C
0	$8,2 \pm 6,0^{Aa}$	$9,3 \pm 4,8^{Aa}$	$10,8 \pm 6,5^{Aa}$
5	$10,3 \pm 6,1^{Aab}$	$12,0 \pm 5,7^{Aab}$	$14,17 \pm 8,1^{Aab}$
15	$12,5 \pm 6,7^{Aabc}$	$13,5 \pm 6,1^{Aabc}$	$13,3 \pm 5,9^{Aab}$
30	$15,3 \pm 6,4^{Aabc}$	$15,8 \pm 5,9^{Aabcd}$	$15,3 \pm 5,8^{Aab}$
60	$15,8 \pm 5,3^{Abc}$	$15,8 \pm 6,2^{Aabcd}$	$16,7 \pm 5,4^{Ab}$
90	$23,5 \pm 12,3^{Ac}$	$19,67 \pm 7,6^{Abcd}$	$20,5 \pm 5,7^{Abc}$
120	$26,0 \pm 9,3^{Ac}$	$21,6 \pm 7,5^{Acd}$	$23,7 \pm 6,3^{Ac}$
180	$28,0 \pm 7,2^{Ac}$	$22,8 \pm 7,7^{Acd}$	$25,8 \pm 6,8^{Ac}$

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística dentro do mesmo grupo no decorrer do tempo ($P < 0,05$).

Tabela 2 - Taxa de degradação média da motilidade espermática (TDM) no sêmen canino verificada durante o teste de termorresistência a 37°C no uso do diluidor à base de água de coco (Grupo A), água de coco + AIA (Grupo B), água de coco + gema + AIA (Grupo C).

Grupos	TDM
A	7,5 ^a
B	77,5 ^b
C	78,3 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

água de coco na diluição do sêmen caprino a 37°C; NUNES (1985) e TONIOLLI (1988), utilizando o mesmo diluidor, observaram valores de TDM entre 20 e 40% para o sêmen suíno, na mesma temperatura e tempo de avaliação; TEIXEIRA *et al.* (1994) observaram uma TDM de 41,93% em ovinos, também utilizando água de coco a 37°C após 120 minutos. No presente estudo, após 180 minutos, observou-se uma TDM de 7,5% para o sêmen canino a 37°C com o diluidor à base de água de coco. Esta baixa taxa de degradação encontrada, provavelmente, deve-se ao fato de o sptz canino apresentar uma maior resistência à temperatura, quando comparado a outras espécies (WATSON & PLUMMER, 1985). Entretanto, apesar desta resistência, ao se adicionar AIA ao diluidor, foi evidenciada uma alta TDM.

Os resultados obtidos neste experimento sugerem que o diluidor à base de água de coco é eficaz na conservação do sêmen canino a 37°C por até 180 minutos, sendo que a adição de ácido 3-indol-acético proporciona um aumento da TDM, possivelmente por exaurir as reservas energéticas da célula espermática. Dessa forma, recomenda-se utilizar o sêmen canino diluído em água de coco para a realização de inseminações artificiais em um período de 180 minutos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Effem Produtos Alimentícios pelo fornecimento da ração Pedigree® e aos responsáveis pelos canis da Polícia Militar do Ceará e particulares que cederam seus animais para realização do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Relação entre o espectrofotômetro e a câmara de Neubauer na determinação da concentração espermática do sêmen canino. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UECE, 6, 1997, Fortaleza-Ce. *Anais...* Fortaleza, Ce : Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 1997. V.1. 472p. p.284.

- CORTEEL, J.M. Motilité et fécondance des spermatozoïdes de bouc. **An Zoot**, v.25, p.576-71, 1976.
- CHRISTIANSEN, I.J. **Reproduction in the dog and the cat**. London : Baillière Tindall, 1984. p.99-100.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog's semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.243-255, 1993.
- FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.25, n.104, p.37-40, 1964.
- HERMAN, H.A.; SWANSON, E.W. **Variations in dairy bull semen with respect to its use in artificial insemination**. S.L : Univ Mo Agr Exp Sta Bull, 1941. 326p.
- MILITÃO, S.F.; POSSO, C.S.; SOUZA, F.M. Avaliação de diluidores alternativos para a inseminação artificial em capotes (*Numida meleagris*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda, Pe. **Anais...** Olinda, PE : Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. 656p. p.534.
- NUNES, J.F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.06, p.329-342, 1985.
- NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de côco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza, Ce. **Anais...** Fortaleza, Ce : Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes / UECE, 1995. p.53-64.
- NUNES, J.F.; SALES, F.G.M. El agua de coco (*Cocos nucifera*) *in natura* integral y adicionados con citoquininas con dilutor do semen caprino. **Rev Cient**, v.3, p.273-281, 1993.
- PLATZ, C.C.; SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Lab Anim Sci**, v.27, n.6, p.1013-1016, 1977.
- RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado**. Porto Alegre, RS, 1997. 176p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.
- ROTA, A.; STROM, 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.
- SALLES, M.G.F. **Água de coco (*Cocos nucifera*) *in natura* e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor de sêmen caprino**. Porto Alegre, RS, 1989. 176p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. **Ciência Rural**, v.30, n.6, p.1021-1025, 2000.
- SOUZA, N.M.; TEIXEIRA, M.D.A.; OLIVEIRA, L.F., *et al.* Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidores do sêmen ovino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda-Pe. **Anais...** Olinda, PE : Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. 656p. p.583.
- TEIXEIRA, M.D.A.; RODRIGUES, A.P.R.; SOUSA, N.M., *et al.* Avaliação da taxa de degradação da motilidade do sêmen de ovinos deslanados e caprinos, diluídos em água de coco e suas frações. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda, Pe. **Anais...** Olinda, PE : Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. 656p. p.589.
- TONIOLLI, R. **Avaliação *in vitro* do sêmen de caprinos de raças nativas do Nordeste brasileiro diluído em água de coco sob a forma *in natura* estabilizada e de gel**. Fortaleza, Ce, 1988. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, 1988.
- 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.
- WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: INTERNATIONAL CONF ON DEEP FREEZING BOAR SEMEN, 1985. **Proceedings...** v.1, p.113 - 127, 1985.
- YUBI, A.; FERGUSON, J.M.; RENTON, J.P., *et al.* Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen. **J Small Animal Pract.**, v.28, p.753-761, 1987.