

## CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DO CÃO APÓS DILUIÇÃO E RESFRIAMENTO (*Canine semen characteristics after dilution and cooling*)

WEISS, R.R.<sup>1</sup>; MESSIAS, C.M.<sup>2</sup>; CALOMENO, M.A.<sup>3</sup>; MURADÁS, P.R.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de medicina veterinária, Setor de Ciências Agrárias, UFPR;

<sup>2</sup>Médica Veterinária, Mestre em Ciências Veterinárias, UFPR;

<sup>3</sup>Mestranda do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR;

<sup>4</sup>Médica Veterinária autônoma.

**RESUMO** – O objetivo do presente trabalho foi de avaliar a eficiência de quatro diferentes diluentes na conservação do sêmen canino, no decorrer de 96 horas de armazenamento a 5°C. Para o experimento foram selecionados dois cães sem raça definida, de mesma idade e porte. Foram colhidos cinco ejaculados de cada cão durante cinco semanas, sendo que os ejaculados foram diluídos respectivamente em TRIS-gema (A), leite desnatado reidratado(B), TRIS-gema + secreção prostática (C) e leite desnatado reidratado + secreção prostática(D). As amostras foram avaliadas antes da diluição e na hora 0 (imediatamente após a diluição), 24, 48, 72 e 96 horas pós-resfriamento a 5°C, assim como as amostras de sêmen não diluído foram avaliadas da mesma forma, para efeitos comparativos. A avaliação do sêmen deu-se através da motilidade progressiva e da integridade de acrosssoma. A motilidade espermática mínima de 50,0 %, permaneceu em 53,5% até 72 horas para a diluição do sêmen canino em diluente A; em 59,5 % até 48 horas para o diluente B; em 61,5 % até 48 horas para o diluente C e em 57,5 % até 24 horas para o diluente D. Por sua vez as células espermáticas mantiveram a integridade de acrossomo em 66,5%, 65,4%, 74,2% e 64,7% até 96 horas pós-diluição e resfriamento para os diluentes A, B,C e D, respectivamente. Pôde-se concluir que o diluente TRIS-gema mostrou-se superior aos demais, porque manteve a motilidade espermática por mais tempo. O sêmen não diluído foi incapaz de manter a motilidade progressiva dentro das 24 horas, embora tenha mantido a integridade de acrossomo até 72 horas após sua obtenção.

**Palavras chaves:** diluentes, sêmen, cão.

**ABSTRACT** – The aim of the current study was to evaluate the efficiency of four different diluents for canine semen preservation during 96 hours of storage at 5 °C. Two mixed-breed dogs of about the same age and size were used for this study. Five ejaculates were collected from each dog within five weeks, and the ejaculates were divided in TRIS-yolk (A), re-hydrated milk without cream (B), TRIS-yolk + prostatic secretion (C) and re-hydrated milk without cream + prostatic secretion (D). The samples were evaluated before dilution was performed and at times 0 (immediately after dilution), 24, 48, 72 and 96 hours after-cooling at 5 °C, as well as the non-diluted semen samples (for comparative purposes). The semen evaluation was performed accessing progressive motility and the acrosomal integrity. The minimal spermatic motility was of 50.0 % and remained in 53.5% until 72 hours for diluent A; 59.5% until 48 hours for diluent B, 61.5% until 48 hours for diluent C and 57.5% until 24 hours for diluent D. The spermatic cells sustained the acrosomal integrity in 66.5%, 65.4%, 74.2% and 64.7% until 96 hours after dilution and cooling for diluents A, B, C and D, respectively. In conclusion, the TRIS-yolk diluent was superior because it sustained the spermatic motility for a longer period. The non-diluted semen was unable to maintain the progressive motility within the 24 hours, although it kept the acrosomal integrity until 72 hours after being collected.

**Key words:** canine, semen, diluent.

## Introdução

A criação de cães vem crescendo significativamente nos últimos anos. Muitos pesquisadores estão utilizando a seleção para aperfeiçoar as raças, aparecendo reprodutores de elevado valor, exigindo por conseguinte a aplicação das biotécnicas reprodutivas, visando melhor aproveitamento genético (FORSBERG e FORSBERG, 1993).

O congelamento do sêmen assegura a capacidade fecundante por longo tempo, o que é desejável no comércio internacional de material genético, inclusive de reprodutores já mortos. Entretanto nem todos os reprodutores possuem sêmen com características ideais para o congelamento, fazendo-se necessário o desenvolvimento de outras técnicas para o seu transporte, como o resfriamento, possibilitando a inseminação artificial (AI) de fêmeas mesmo distantes do local onde encontra-se o reprodutor (GABALDI e LOPES, 1998).

A fertilidade do sêmen diluído após a coleta, mantém-se por 72 horas no máximo segundo GÜNZEL-APEL e KRAUSE (1986). Ao se tratar de exportação de sêmen, esse tempo muitas vezes torna-se insuficiente, sendo necessário desenvolver meios diluidores capazes de conservar o sêmen a 5°C, com suficiente percentual de motilidade progressiva e integridade de acrosoma por um período de tempo mais longo (BOUCHARD et al., 1990).

Segundo relatos de MCCONNEL et al. (1987), a motilidade espermática é dependente da fonte energética mitocondrial adenosina trifosfato (ATP). FRENETTE et al. (1986), relataram que a fosfatase ácida é sintetizada pela próstata e a alcalina pela cauda do epididímo e ducto deferente.

O objetivo do presente trabalho foi o de comparar o tempo de conservação do sêmen canino, em quatro diferentes diluentes a 5°C, relativo aos aspectos de motilidade espermática progressiva e integridade de acrosomo.

## Materiais e Métodos

Foram utilizados dois cães sem raça definida (SRD), com idade em torno de três anos e de porte médio, provenientes do Canil Municipal da Prefeitura de Curitiba – Paraná. Os animais

foram mantidos em Box individual nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná e alimentados com ração comercial (Special Croc - Royal Canin) com as características de: umidade (max.) 10%, proteína bruta (min.) 22%, extrato etéreo (min.) 8%, matéria fibrosa (max.) 4% e cálcio (max.) 1,8%. A quantidade ingerida foi calculada de acordo com o peso corporal dos animais e a água foi servida à vontade. Os animais foram submetidos a avaliação clínica, vacinados e vermifugados antes do início do experimento.

O sêmen foi coletado por meio de manipulação manual e colhido com um funil de vidro acoplado a um tubo de ensaio de vidro graduado e aquecido à temperatura de 37°C. Como não foi possível separar a primeira e a segunda fração do ejaculado, elas foram divididas como uma só em cinco partes iguais em tubos de ensaio pré-aquecidos e mantidos à temperatura ambiente (15-25°C). As amostras de sêmen foram diluídas na proporção de acordo com o volume obtido sendo que de 0,3 a  $0,5 \times 10^6/\text{mm}^3$  a diluição foi de 1:3; de 0,5 a  $0,8 \times 10^6/\text{mm}^3$  de 1:4 e acima de  $0,8 \times 10^6/\text{mm}^3$  a diluição foi de 1:5.

A primeira amostra foi diluída com TRIS (80ml de solução base: trishidroximetil-aminometano 3,02g, frutose 1,25g, ácido cítrico 1,78g, água bidestilada q.s.p. 100 ml) e 20 ml de gema (Diluente A). A segunda foi diluída com 2,4g de leite desnatado, 4,9g de glicose e água bidestilada q.s.p. 100 ml (Diluente B). A terceira solução constituiu-se de TRIS-gema mais secreção prostática (Diluente C) e a quarta amostra foi diluída com leite desnatado mais secreção prostática (Diluente D), sendo o critério de diluição, conforme o descrito acima. A avaliação do sêmen seguiu os critérios propostos por KRAUSE (1966).

O método utilizado para a análise estatística foi o delineamento em blocos, sendo a variância analisada em parcelas subdivididas e comparada pelo Teste de Tukey.

## Resultados e Discussão

Foi avaliada a conservação do sêmen canino à 5°C, no decorrer de 96 horas, utilizando-se quatro diluentes. Como critérios de avaliação foram consideradas a motilidade progressiva e

## Características do sêmen do cão após diluição e resfriamento

a integridade de acrossoma.

A motilidade progressiva (TABELA 1) do sêmen diluído com TRIS-gema (diluente A) e leite desnatado (diluente B), após 96 horas, foi de 45,5% e 32,0% respectivamente, o que corresponde a uma diferença respectiva de 35,5% e 48,5% em relação a motilidade inicial de cada diluente. Portanto o diluente A obteve motilidade progressiva significativamente superior ( $p<0,01$ ) ao diluente B após as 48 horas. Este resultado difere dos resultados encontrados por MÜLLER (1992), o qual não encontrou diferença significativa entre a motilidade progressiva com diluente TRIS-

gema e leite desnatado, após 96 horas.

Na diluição do sêmen com TRIS-gema + secreção prostática (diluente C) e leite desnatado + secreção prostática (diluente D), houve redução significativa na motilidade progressiva após as 24 horas, o que segundo GÜNZEL-APEL e EKROD (1991) é atribuída à maior liberação de energia obtida pela desfosforilação do ATP, explicando a taxa de motilidade progressiva inferior a 50% encontrada com diluentes acrescidos de secreção prostática (C e D), considerando-se que 50% é o valor mínimo necessário, para se assegurar a fertilidade do sêmen canino diluído e conservado a 5°C (GÜNZEL-APEL e KRAUSE, 1986).

TABELA 1 – MOTILIDADE PROGRESSIVA DO SEMEN CANINO FRENTE AOS DILUENTES TRIS-GEMA, LEITE DESNATADO, TRIS-GEMA + SECREÇÃO PROSTÁTICA E LEITE DESNATADO + SECREÇÃO PROSTÁTICA (PORCENTAGEM / HORA). CURITIBA (PR), 1999.

Diluentes (média %)	Hora				
	0	24	48	72	96
TRIS-gema (A)	81,0 <sup>a</sup>	74,0 <sup>a</sup>	65,5 <sup>a</sup>	53,5 <sup>a</sup>	45,5 <sup>a</sup>
Leite desnatado (B)	80,5 <sup>a</sup>	70,5 <sup>a</sup>	59,5 <sup>b</sup>	41,5 <sup>b</sup>	32,0 <sup>b</sup>
TRIS-gema + secreção prostática (C)	81,5 <sup>a</sup>	66,0 <sup>b</sup>	61,5 <sup>ab</sup>	39,0 <sup>b</sup>	22,0 <sup>c</sup>
Leite desnatado + secreção prostática (D)	79,5 <sup>a</sup>	57,5 <sup>c</sup>	45,0 <sup>c</sup>	28,0 <sup>c</sup>	5,5 <sup>d</sup>
Sem diluição	81,5 <sup>a</sup>	35,0 <sup>d</sup>	20,0 <sup>d</sup>	5,0 <sup>d</sup>	0,0 <sup>e</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> Valores da mesma coluna que diferem significativamente entre si ( $p<0,01$ ).

No percentual de espermatozoides com acrossoma intacto, com a utilização dos diluentes A e B, houve uma continua redução durante as 96 horas de armazenamento, existindo contudo, 65% de células espermáticas com acrossoma intacto após as 96 horas. As alterações acrossomais acentuaram-se com os diluentes acrescidos de secreção prostática (C

e D), como mostra a TABELA 2.

Tais resultados corroboram com os trabalhos de SAACKE e WHITE (1972), ao demonstrarem a inexistência de correlação direta entre motilidade progressiva e alterações acrossomais. Este fato acentua a necessidade da apreciação dos dois parâmetros na avaliação do sêmen.

TABELA 2 – PORCENTAGEM DE ESPERMATOZOIDES COM ACROSSOMA INTACTO, NO SEMEN CANINO FRENTE AOS DILUENTES TRIS-GEMA, LEITE DESNATADO, TRIS-GEMA + SECREÇÃO PROSTÁTICA E LEITE DESNATADO + SECREÇÃO PROSTÁTICA (PORCENTAGEM / HORA). CURITIBA (PR), 1999.

Diluentes (média %)	Hora				
	0	24	48	72	96
TRIS-gema (A)	96,1 <sup>a</sup>	87,2 <sup>a</sup>	84,2 <sup>a</sup>	74,3 <sup>b</sup>	66,5 <sup>b</sup>
Leite desnatado (B)	95,6 <sup>a</sup>	87,5 <sup>a</sup>	84,2 <sup>a</sup>	74,1 <sup>b</sup>	65,4 <sup>b</sup>
TRIS-gema + secreção prostática (C)	95,7 <sup>a</sup>	84,6 <sup>b</sup>	83,1 <sup>a</sup>	78,0 <sup>a</sup>	74,2 <sup>a</sup>
Leite desnatado + secreção prostática (D)	96,2 <sup>a</sup>	80,7 <sup>c</sup>	78,4 <sup>b</sup>	71,3 <sup>b</sup>	64,7 <sup>b</sup>
Sem diluição	95,5 <sup>a</sup>	77,8 <sup>d</sup>	58,1 <sup>c</sup>	50,9 <sup>c</sup>	30,5 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Valores da mesma coluna que diferem significativamente entre si ( $p<0,01$ ).

## Conclusão

Os resultados desse trabalho permitem concluir que a motilidade espermática mínima de 50,0 %, permaneceu em 53,5% até 72 horas para a diluição em TRIS-gema; em 59,5 % até 48 horas para o leite desnatado; em 61,5 % até 48 horas para TRIS-gema + secreção prostática e em 57,5 % até 24 horas para leite desnatado + secreção prostática. Por sua vez as células espermáticas mantiveram a integridade de acrossomo em 66,5%, 65,4%, 74,2 e 64,7% até 96 horas pós diluição respectivamente para os diluentes A, B,C e D. O sêmen não diluído foi incapaz de manter a motilidade progressiva dentro das 24 horas, embora tenha mantido a integridade de acrossomo até 72 horas após sua obtenção.

## Referências

- BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D. Effect of storage temperatures, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, Missouri, v.34, n.1, p.147-157, 1990.
- FORSBERG, L.; FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. *Journal Reproduction and Fertility*, Supplement, London, v.47, p.313-323, 1993.
- FRENETTE, G; DUBE, J.Y.; TREMBLAY, R.R. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. *Archives of Andrology*, Quebec, v.16, n.3, p.235-241, 1986.

Recebido: 30/06/2003

Aprovado: 24/10/2003

GABALDI, S.; LOPES, M. Considerações sobre congelação de sêmen canino. *Clínica Veterinária*, São Paulo, n.14, maio-jun., 1998.

GÜNZEL-APEL, A.R.; EKROD, B. Einflüsse Von Prostatasekret und verdünner auf die Spermienmotilität und ATP-Konzentration sowie die Aktivität der sauren und alkalischen phosphatase von Beagle\_samen. *Reproduction in Domestics Animal*, Hannover v.26, n 1, p 31-41, 1991.

GÜNZEL-APEL, A.R.; KRAUSE, D. Laufigkeitsüberwachung und Samenübertragung beim Hund. Hannover Tierärztliche Hochschule, *Umschau*, v.8, p.564-570, 1986.

KRAUSE, B. *Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde*. These, Hannover, Tierärztliche Hochschule, 1966.

MCCONELL, J.D.; STONE, D.K.; JOHNSON, L.; WILSON, M. Partial purification and characterization of dynein adenosine triphosphatase from bovine sperm. *Biology of Reproduction*, Madison, v.37, p.385-393, 1987.

MÜLLER, A. *Einflüsse verschiedener Verdünnermedien auf Motilität und Kopfkapenintegrität von flüssigkonservierten Hundesperma*. Hannover, These, Hannover, Tierärztliche Hochschule, 1992.

SAACKE, R.G; WHITE, J.M. Semen quality test and their relationship to fertility. In: TECHNOLOGIC CONFERENCE ANIMAL REPRODUCTION ARTIFICIAL INSEMINATION BREED, 4., Chicago, 1972. *Proceedings*. Chicago, 1972. p.22-27.