

## Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C

Janaina de Fátima Saraiva Cardoso<sup>1\*</sup>, Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>1</sup>,

Daniel Couto Uchoa<sup>2</sup>, Lúcia Daniel Machado da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Campus Profa. Cinobelina Elvas, Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, PI, Brasil. \*Autor correspondente. e-mail: janainadefatima@hotmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

### Resumo

A refrigeração 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. O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes concentrações de gema de ovo para o resfriamento a 5 °C do sêmen canino diluído em ACP®-106. Ejaculados de cães (n=10) foram diluídos e refrigerados a 4 °C em ACP®-106 sem gema de ovo (controle) ou contendo 5, 10, ou 20% de gema de ovo. Foi observada uma redução significativa no pH do diluidor com o uso de 20% de gema de ovo no segundo dia de resfriamento e após o terceiro dia nos grupos contendo 5 e 10% de gema. No primeiro dia de refrigeração o uso de 20% de gema de ovo possibilitou motilidade espermática superior apenas a do grupo contendo 5% de gema. Após cinco dias de conservação o uso de 5 e 10% de gema de ovo resultou em motilidade inferior ao do grupo controle. A motilidade sofreu redução significativa no primeiro dia no grupo controle, após dois dias no grupo contendo 5% de gema e após três dias nos demais grupos. O vigor, morfologia espermática e acrossomal, percentual de espermatozoides com membranas funcionais foram protegidas de maneira semelhante em todos os grupos testados. Diante do exposto, conclui-se que a inclusão de gema de ovo influencia a manutenção do pH no diluidor ACP-106 e que o sêmen pode ser conservado por até dois dias utilizando 10 ou 20% de gema de ovo.

**Palavras-chaves:** cão, gema de ovo, água de coco

### Different egg yolk concentrations on the quality of the canine semen diluted in ACP®-106 and chilled under 4 °C

#### Abstract

Semen chilling procedure preserves gametes without reaching the freezing point, which induces deleterious intracellular changes that affect viability and fertilizing potency of spermatozoa. The aim of this work was to compare different egg yolk concentration for dog semen chilling at 5 °C extended in ACP®-106. ACP-Ejaculated of dogs (n=10) were diluted and chilled in ACP -106 without (control group) or containing 5, 10 or 20% egg yolk. Was observed a significant reduction in extender pH using 20% egg yolk on the second day of chilling and after the third day of chilling when using 5 and 10% egg yolk. At the first day of chilling 20% egg yolk extender result in better sperm motility in comparing 5% egg yolk group. After five days of storing, the use of 5 and 10% were inferior to the control group. The reduction on motility was significant at the first day of chilling in the control group, after two days on group with 5% egg yolk and after three days in the other groups. The vigor, sperm and acrossomal morphology, functional plasma membrane integrity were similar in all groups tested. In conclusion, the egg yolk influences the maintenance of the pH in the extender ACP-106 and that the canine semen can be efficiently conserved for up to two days using 10 or 20% egg yolk.

**Key words:** dog, egg yolk, coconut water

## Introdução

O sêmen diluído e refrigerado 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: diluído, refrigerado e estocado a 5 °C, ou congelado e conservado por tempo indeterminado a -196 °C (England & Ponzio, 1996). A refrigeração 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 refrigeração 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 fosfolípidios (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 (Toniolli 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®-106 o diluidor para uso no sêmen canino (Carneiro et al., 2005).

Um componente largamente utilizado na composição dos diluidores de sêmen é a gema de ovo, que apresenta propriedades nutritivas e protetoras de membrana contra o choque térmico (England, 1993; Moussa et al., 2002). Segundo 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. Estes mesmos autores relataram que 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 (Farstard, 1996).

Embora a gema de ovo seja um importante componente dos diluidores comumente empregado para a refrigeração do sêmen canino, diversos autores recomendam apenas o empregado de 20% de gema de ovo independente de composição do diluidor utilizado (Rota et al., 1995; Iguer-Ouada & Verstegen, 2001). 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 refrigerado.

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®-106.

## Material e Métodos

### Animais Experimentais

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  $\geq 3$ , e menos de 15 % de espermatozóides com alterações morfológicas.

### Preparação dos diluidores

O diluidor ACP®-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 5, 10 e 20% e um grupo controle sem gema de ovo. 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 de 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 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.

#### Avaliação do sêmen

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®). 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 de luz, com aumento final de 100x, 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 (1000x). Na avaliação morfológica, os espermatozóides 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).

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 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 de luz em 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 com enrolamento de cauda indicativo de edema de cauda foram considerados como apresentando membrana funcional. As amostras de sêmen foram avaliadas fisicamente e microscopicamente, como descrito anteriormente, após a diluição e a cada 24 horas.

#### 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 pela análise de variância (ANOVA) procedimento GLM e as médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ . 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 era observada motilidade em um mínimo de cinco replicatas em pelo menos um grupo.

#### Resultados e Discussão

O sêmen fresco apresentou cor branca opalescente e viscosidade leitosa. Os valores espermáticos de motilidade, vigor, concentração e morfologia estão apresentados na Tabela 1.

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

Parâmetro	Média ± Desvio Padrão
Volume (mL)	1,22 ± 0,58
Motilidade (%)	98,5 ± 2,4
Vigor (0-5)	5 ± 0
Espermatozóides morfológicamente normais (%)	92,1 ± 4,41
Espermatozóides com membrana funcional (%)	91,25 ± 5,50
Acrossomas normais (%)	97,9 ± 2,42
Concentração espermática (x 10 <sup>6</sup> spzt/mL)	687 ± 292,54
pH	7 ± 0

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

A motilidade espermática foi semelhante entre os grupos, exceto após um dia de resfriamento onde o grupo contendo 20% de gema de ovo foi superior ao grupo contendo 5% e após cinco dias de resfriamento os grupos contendo 5 e 10% de gema de ovo foram inferiores ao controle (Tabela 2). O efeito benéfico de gema de ovo na

**Tabela 2.** Motilidade (média ± EP) do sêmen canino diluído em ACP-106® contendo diferentes concentrações de gema de ovo e resfriado a 4°C.

Dia de avaliação	Concentração de gema de ovo			
	Controle	5%	10%	20%
Diluição	96,0 ± 1,63 aA	98,0 ± 0,82 aA	98,50 ± 0,76 aA	98,5 ± 0,76 aA
1	82,0 ± 7,89 abB	67,50 ± 8,60 aABC	83,00 ± 4,90 abA	86,80 ± 3,18 bA
2	72,0 ± 7,89 aC	47,50 ± 10,09 aB	55,00 ± 11,64 aAC	68,80 ± 9,53 aAC
3	64,0 ± 5,16 aC	34,0 ± 10,56 aB	37,5 ± 12,68 aBC	46,0 ± 12,78 aBC
4	54,0 ± 5,16 aD	22,00 ± 9,04 aBC	24,00 ± 11,08 aBC	37,0 ± 12,02 aBC
5	46,0 ± 8,43 aD	10,50 ± 6,26 bD	12,00 ± 8,14 bB	22,50 ± 9,17 ab B

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente:  $P < 0,05$ .  
Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente:  $P < 0,05$ .

preservação de motilidade do espermatozóide canino foi demonstrado previamente por Iguer-Ouada & Verstegen (2001).

As características vigor (Tabela 3), morfologia espermática (Tabela 4) e acrossomal (Tabela 7), percentual de espermatozoides com membranas funcionais (Tabela 6) foram protegidas de maneira semelhante em todos os grupos testados.

A principal diferença entre os grupos foi em relação ao pH. Após o segundo dia de resfriamento, o grupo contendo 20% de gema de ovo apresentou pH significativamente inferior ao grupo controle (Tabela 5). O mesmo foi observado para os grupos contendo 5 e 10% de gema de ovo após o terceiro dia de refrigeração. No grupo controle o pH permaneceu sem alteração significativa durante todo o período de refrigeração (Tabela 5).

**Tabela 3.** Vigor (média ± EP) do sêmen canino diluído em ACP®-106 contendo diferentes concentrações de gema de ovo e resfriado a 4°C

Dia de avaliação	Concentração de gema de ovo			
	Controle	5%	10%	20%
Diluição	5,0 ± 0aA	5,0 ± 0aA	5,0 ± 0aA	5,0 ± 0aA
1	3,8 ± 0,49aB	3,95 ± 0,24aAB	4,6 ± 0,22aA	4,7 ± 0,13aAB
2	3,5 ± 0,45aB	3,25 ± 0,46aAB	3,55 ± 0,63aA	4,0 ± 0,49aABC
3	2,9 ± 0,41aBC	2,05 ± 0,70aB	2,4 ± 0,69aA	2,85 ± 0,69aB
4	2,8 ± 0,39aBC	1,0 ± 0,54aB	2,15 ± 0,72aA	2,3 ± 0,62aABC
5	2,2 ± 0,33aC	0,4 ± 0,40aB	1,4 ± 0,58aA	1,6 ± 0,60aC

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente: P<0,05.  
Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente: P<0,05.

**Tabela 4.** Porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais (média ± dp) no sêmen canino após a diluição (dil) e resfriamento em ACP®-106 contendo diferentes concentrações de gema de ovo.

Dia de avaliação	Concentração de gema de ovo			
	Controle	5%	10%	20%
Diluição	91,05 ± 3,99aA	93,15 ± 2,24aA	91,75 ± 6,02aA	92,55 ± 3,76aA
1	83,9 ± 6,12aAB	88,7 ± 5,77aAB	87,35 ± 6,36aAB	85,5 ± 6,24aAB
2	83,72 ± 7,03aAB	87,4 ± 6,60aAB	85 ± 6,31aAB	82,3 ± 3,95aB
3	79,89 ± 9,82aB	86 ± 3,92aB	83,88 ± 5,87aB	82,11 ± 6,01aB
4	81,67 ± 9,19aB	83,2 ± 7,60aB	84,71 ± 7,30aABC	82,57 ± 6,78aB
5	80,11 ± 10,04aB	81,67 ± 4,04aB	77 ± 7,11aC	80,29 ± 11,67aB

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente: P<0,05.  
Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente: P<0,05.

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

Dia de avaliação	Concentração de gema de ovo			
	Controle	5%	10%	20%
Diluição	7 ± 0aA	7 ± 0aA	7 ± 0aA	7 ± 0aA
1	7 ± 0aA	7 ± 0aA	7 ± 0aA	6,8 ± 0,42aAB
2	7 ± 0aA	6,8 ± 0,42abAB	6,7 ± 0,48abAB	6,4 ± 0,52bBC
3	7 ± 0aA	6,5 ± 0,53abB	6,44 ± 0,53abB	6,1 ± 0,32bC
4	7 ± 0aA	6,5 ± 0,55bABC	6,17 ± 0,41bcC	6 ± 0cC
5	6,89 ± 0,34aA	6 ± 0bC	6 ± 0bC	6 ± 0bC

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente: P<0,05.  
Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente: P<0,05.

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

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

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente: P<0,05.  
Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente: P<0,05.

**Tabela 7.** Porcentagem de espermatozoides apresentando acrossomas morfologicamente normais (média ± dp) no sêmen canino após a diluição e resfriamento em ACP®-106 contendo diferentes concentrações de gema de ovo.

Dia de avaliação	Concentração de gema de ovo			
	Controle	5%	10%	20%
Diluição	97,2 ± 1,48aA	97 ± 1,25aA	96 ± 1,41aA	95,8 ± 2,044aA
1	87,1 ± 6,87aAB	92 ± 4,47aAC	90,1 ± 5,61aAB	90,3 ± 4,24aAC
2	85,67 ± 6,847aB	84,4 ± 7,62aBC	86,3 ± 7,15aABC	85,6 ± 6,10aBC
3	85 ± 6,32aB	85 ± 6,80aBC	83,13 ± 9,45aB	84,11 ± 7,62aBC
4	83,22 ± 10,65aB	76,6 ± 11,35aB	84,29 ± 9,45aABC	80,29 ± 8,69aB
5	83,89 ± 10,71aB	81 ± 5aBC	73 ± 18,52aC	80 ± 12,45aB

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente: P<0,05.  
Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente: P<0,05.

Verstegen et al. (2005), verificaram uma redução dos efeitos deletérios da acidificação do meio sobre a célula espermática pela troca do meio diluidor e reativação da motilidade após queda significativa neste parâmetro.

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 refrigerado e posteriormente reaquecido parece ser menos prejudicado no processo de criopreservação 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 refrigerado 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 refrigerado é inferior a do sêmen congelado/descongelado (England & Ponzio, 1996).

Já segundo Verstegen et al. (2005) a motilidade superior a 70% no sêmen canino refrigerado pode ser mantida por até 21 dias utilizando o diluidor Tris-glicose contendo 20% de gema de ovo e realizando a troca do meio diluidor nos dias 11 e 21.

Após a refrigeração, 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 a refrigeração. Esse fenômeno tem sido atribuído à sensibilidade térmica da bomba sódio-potássio-ATPase e subsequente dispersão de íons (Ponglowhapan et al., 2004).

A redução na motilidade foi significativa em comparação ao sêmen diluído, antes da refrigeração, após o primeiro dia no grupo controle, após o segundo dia no grupo contendo 5% de gema e após o terceiro dia nos demais grupos (Tabela 2). Da mesma forma, a redução no vigor, foi significativa após um dia de refrigeração no grupo controle e após três dias nos grupos contendo 5 e 20% de gema de ovo. No grupo 10%,



o vigor permaneceu sem alteração significativa durante o período de refrigeração (Tabela 3).

Embora não tenha sido observada diferença significativa entre a motilidade nos grupos controle, 10% e 20% de gema de ovo após um dia de refrigeração, foi verificada uma redução significativa na motilidade do grupo controle em relação ao sêmen fresco diluído. Redução semelhante a essa foi observada somente após dois dias de refrigeração para o grupo 5% e três dias para os grupos contendo 10% e 20% de gema de ovo. Essas observações reforçam a necessidade de adição de gema de ovo como protetor de resfriamento nos primeiros dias de refrigeração apesar dos possíveis efeitos indesejados oriundos da sua utilização.

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). Neste trabalho foi observada uma redução significativa no percentual de espermatozoides morfolologicamente normais após dois dias no grupo contendo 20% de gema de ovo e três dias nos demais grupos quando comparado aos valores após a diluição (Tabela 4). Contudo o percentual médio de espermatozoides morfolologicamente normais esteve acima de 70%, mesmo após cinco dias de refrigeração (Tabela 4).

Oettlé (1993) relata ainda que a fertilidade reduz-se à medida que se aumenta o percentual de espermatozoides anormais, e quando a proporção de espermatozoides morfolologicamente 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 endosse 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). Neste trabalho, não foram observadas diferenças entre os grupos testados durante o período de refrigeração (Tabela 6). Contudo, foi observada redução significativa no percentual de espermatozoides apresentando membranas funcionais após o segundo dia de refrigeração nos grupos controle e 20% e após o terceiro dia nos demais grupos (Tabela 6).

Em relação à morfologia acrossomal, não houve um efeito protetor da inclusão de gema de ovo neste trabalho (Tabela 7). Após o segundo dia de refrigeração foi observada uma redução no percentual de espermatozoides apresentando acrossomas normais após o segundo dia de refrigeração nos grupos controle, 5% e 20% e somente após o terceiro dia no grupo contendo 10% de gema de ovo (Tabela 7).

Neste trabalho, a inclusão de gema de ovo mesmo e em baixa concentração (5%) foi suficiente para promover a acidificação do meio diluidor e provocar possíveis efeitos deletérios que provavelmente foram mais significativos que os efeitos benéficos da gema de ovo tendo em vista não ter sido verificada melhor qualidade espermática nas amostras refrigeradas em diluidores contendo gema de ovo em relação ao grupo controle.

Por outro lado, a presença de açúcares como a glicose, frutose e sacarose presentes na água de coco poderia ter conferido proteção ao espermatozói de nas amostras do grupo controle permitindo um bom desempenho das amostras refrigeradas. 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.

Iguer-Ouada & Verstegen (2001) demonstraram que a gema de ovo apresentava um efeito protetor sobre o acrossoma, sendo observada melhor conservação da integridade acrossomal e prevenção da ocorrência da reação acrossômica espontânea nos diluidores suplementados com 20% de gema de ovo.

Varela Junior et al. (2009) observou resultados de motilidade mais satisfatórios que os observados no presente trabalho utilizando o diluidor Tris-glicose contendo 20% de gema de ovo ou LDL na proporção de 6, 8 ou 10%. Contudo a funcionalidade de membrana observada com o uso da gema de ovo ou LDL foi numericamente menor que verificado no presente trabalho. Esses autores observaram ainda uma melhor conservação da motilidade e funcionalidade de membrana pelo uso das LDL durante o período de refrigeração do sêmen canino.

## Conclusões

A inclusão de gema de ovo influencia a manutenção do pH no diluidor ACP-106.

O diluidor ACP-106 contendo 10 ou 20% de gema de ovo é eficiente para a conservação da motilidade do sêmen canino a 4 °C por até dois dias e por um dia contendo apenas 5% de gema de ovo.

## Referências

Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D., Youngquist, R.S. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* 33: 147-157.

- Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. 2003. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology* 59: 743-75.
- Carneiro, R.D., Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Cardoso, J.F.S., Uchoa, D.C., Tavernozzi, L., Ackermann, C.L., Brilhante, D.F., Silva, L.D.M. 2005. Conservação do sêmen canino a 5°C utilizando-se diluidores à base de água de coco *in natura* e em pó (ACP® 106). In: X Semana Universitária da UECE/ XIV Encontro de Iniciação Científica, Fortaleza-Ceará. *Programas e Resumos...* Fortaleza, Brasil. CD-ROM.
- CBRA. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Brasil. 49p .
- Chantler, E., Abraham-Peskir, J.V., Little, S., Mccann, C., Medenwaldt, R. 2000. Effect of Cooling on the Motility and Function of Human Spermatozoa. *Cryobiology* 41: 125-134.
- Christiansen I.J. 1988. Reprodução no cão e no gato. Editora Manole, São Paulo, Brasil, 363p .
- England, G.C.W. 1993. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility* 47: 243-255.
- England, G.C.W., Ponzio, P. 1996. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* 46: 165-171.
- Farstad, W. 1996. Semen Criopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science* 42: 251 - 260.
- Fontenele, P.S., Cardoso, J.F.S., Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. 2002. Conservação a 5°C do sêmen canino diluído em água de coco. *Ciência Animal* 12: 153-156.
- Iguer-Ouada, M. 2001. Procréation Médicalement Assistée dans l'Espèce Canine: Analyse et Préservation à 4 °C du sperm..220f. (Tese de Doutorado em Sciences Vétérinaires) – Université de Liège, Liège, Bélgica.
- Iguer-Ouada, M., Verstegen, J.P. 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55: 671-684.
- Jeyendran, R.S., Van Der Ven, H.H., Perz-Palaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D. 1984. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 219-225.
- Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R., Olson, P.N.S. 2001. *Canine and feline theriogenology*. W.B. Saunders, Philadelphia, USA. 592p.
- Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. 1993. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 47: 313-323
- 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. *Programa e resumos...* Olinda, Brasil. p.534.
- Moussa, M., Mertinet, V., Trimeche, A., Tainturier, M., Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extract from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695 -1706.
- Nunes, J.F. 1995. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. *Ciência Animal* 7: 62-69.
- Oettlé, E.E. 1993. Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 47: 257-260.
- Pereira, B.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M. 2001. Comparação da monta natural e inseminação artificial com sêmen diluído em água de coco em cadelas da raça boxer. *Ciência Animal* 11: 89-91.
- Ponglowhapan, S., Essén-Gustavsson, B., Linde-Forsberg, C. 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62: 1498-1517.
- Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology* 44: 885-900.
- Sampaio Neto, J.C., Salgueiro, C.C.M., Mateos-Rex, E., Nunes, J.F. 2002. Utilização do diluente ACP-106® na refrigeração do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 5: 137-139.

Sousa, N.M., Teixeira, M.D.A., Oliveira, L.F. 1994. 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. Programa e resumos... Olinda, Brasil. p.583.

Spittaler, P.J., Tyler, J.P.P. 1985. Further evaluation of a simple test for determining the integrity os spermatozoal membrane. *Clinic Reproduction Fertility* 3: 187-190.

Toniolli, R., Mesquita, D.S.M. 1990. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 14: 249-254.

Uchoa, D.C., Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Pereira, B.S., Silva, L.D.M. 2002. Conservação do sêmen canino a 37 °C em diluentes à base de água de coco. *Ciência Rural* 32: 91-95.

Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Ulguim, R.R., Alvarenga, M.V.F., Bianchi, I., Corrêa, M.N., Lucia Jr., T., Deschamps, J.C. 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Animal Reproduction Science* 115: 323-327.

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

Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., Tekeli, T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54: 579-585.