

Meio extensor® para manutenção de sêmen canino resfriado em contêiner para transporte a longa distância*

Canine Cooled Semen Extender for Overnight Delivery in a Transport Container

Marcio R. Costa Santos,** Luis E. Ferreira Almeida,*** Fernando J. Rohen Queiroz****

Resumo

Este experimento testou a viabilidade espermática de sêmen canino diluído em meio, à base de leite desnatado, glicose e antibióticos, resfriado e armazenado a 4°C, durante 24 e 48 horas em contêiner para transporte. No Laboratório de Reprodução Animal Assistida (Reprocenter), na Faculdade de Veterinária da UFF, foram selecionados 10 reprodutores, com média de idade de 2,26 anos, provenientes de canis da região de Niterói e Rio de Janeiro para avaliação dos seus ejaculados. As médias das amostras avaliadas imediatamente após a colheita demonstraram boa qualidade do sêmen: 6,5 pH; 86,5% motilidade; 4,5 vigor; 117,10x10⁶/ml concentração; 91,7% total de espermatozoides (Sptz) vivos e 74,7% Sptz normais. Com 24 horas de resfriamento, as médias foram de 79% motilidade; 4,3 vigor e 86,9% total Sptz vivos. Com 48 horas, 73% motilidade; 4,2 vigor e 79,7 Sptz vivos. Os resultados demonstram a eficácia do diluidor testado, de fácil preparo, conservação, baixo custo e que pode ser utilizado por veterinários em clínicas e criatórios, com o mínimo de equipamento para diluição, refrigeração e transporte do sêmen canino à longa distância, armazenado até 48 horas em contêiner.

Palavras-chave: sêmen, diluidor, transporte, refrigeração, canino.

Abstract

This research was carried out to test the use of a special extender (fatless milk, glucose and antibiotics), on the sperm viability of the canine semen cooled and storage at 4°C, during 24 and 48 hours in a transport container. The studied animals are in average 2.26 years-old different breeds stud dogs from Niterói and Rio de Janeiro, worked out on the Assisted Animal Reproduction Laboratory (Reprocenter) at Faculdade de Veterinária - UFF. The checked semen averages after collection showed good quality: 6.5 pH; 86.5% motility; 4.5 (RFM); 117.10x10⁶/ml concentration; 91.70% total alive Sptz and 74.7% normal Sptz, on the 24 hours the averages were 79.0% motility; 4.3 (RFM); 86.9% total alive Sptz, and at 48 hours 73% motility; 4.2 (RFM); 79.7% total alive Sptz. The results showed a good extender that allows fresh cooled canine semen to survive for more than 48 hours after collection from the stud dog and that, as soon as the semen is collected, evaluated and placed in the extender, then it can be shipped in the container, cryopreserved at 4°C, for overnight delivery.

Keywords: semen extender, semen transportation, cryopreservation, canine.

Introdução

O uso do sêmen canino conservado à baixa temperatura no Brasil, ainda não é um procedimento comum, embora seja demonstrado em todo o mundo um crescente interesse pela sua utilização, desde que foi relatado por Harrop em 1954, o nascimento da primeira prole em cães a partir de inseminação artificial com sêmen refrigerado. O interesse na utilização e comercialização de sêmen canino estimulou a criação de bancos de sêmen que podem prover um pool genético para ser utilizado, inclusive, em pequenas populações isoladas geograficamente, de forma a evitar consangüinidade, elimi-

nar doenças hereditárias ou simplesmente encurtar distâncias entre coberturas desejáveis.

O sêmen refrigerado, por não alterar significativamente a sobrevivência dos espermatozoides, é ainda o mais recomendado para a utilização, com transporte a longas distâncias, na inseminação artificial da espécie. Há, no entanto, várias opções de diluidores a serem utilizados para manter a boa qualidade do sêmen refrigerado, capaz de assegurar a alta taxa de concepção, principalmente quando se visa métodos artificiais de reprodução (Threlfall, 1996; Santos e Almeida, 1999).

* Trabalho é parte da Tese de Mestrado de ALMEIDA, 1997, Bolsista CAPES.

** Méd.Vet. Prof.Dr. Depart. Pat. Clín. Vet. UFF/Reprocenter, mrcosta@doutor.com.br – Cx. Postal 100.086, 24000 Niterói, RJ – Brasil.

*** Méd.Vet. Mestre em Reprodução Animal, Clín. Vet. Pet in Rio, Rio de Janeiro,RJ.

**** Méd.Vet. Mestre em Reprodução Animal, Equus Vet., Niterói-RJ.

A falta de dados sobre a fertilidade de cães padreadores nos criatórios nacionais, por si só justifica o presente estudo. No entanto, o maior objetivo deste trabalho foi determinar a eficácia do diluidor modificado para sêmen canino, utilizado no Reproscenter, de fácil conservação, baixo custo, que pode ser preparado por médicos-veterinários em clínicas e criatórios, com o mínimo de equipamento para diluição e refrigeração do sêmen e para transporte, armazenado até 48 horas em contêiner.¹

Material e métodos

Foram utilizados como doadores de sêmen, 10 cães das raças Beagle (1), Cocker Spaniel (1), Dogue Alemão (2), Fila Brasileiro (1), Poodle (3) e Rotweiller (2), com idade entre 1 e 5 anos, clinicamente sadios e com boa conformação corporal. Esses animais, provenientes de criatórios da região de Niterói e do Rio de Janeiro, foram levados ao Laboratório de Reprodução Animal Assistida (Reprocenter), na Faculdade de Veterinária – UFF, para exame andrológico e colheita das amostras. Os ejaculados foram obtidos por manipulação digital e coletados segundo técnica descrita por Almeida (1977), para obtenção da fração espermática, desprezando-se as 1ª e 3ª frações, prostáticas.

Durante as análises iniciais e diluição, o sêmen foi mantido em banho-maria a 37°C, no máximo 10 minutos, até o momento do resfriamento. Foram estudadas as características físicas, macro e microscópicas, segundo a sistematização apresentada por Günzel-Apel (1994).

Cada amostra foi diluída a 1:2, com o meio extensor à base de leite desnatado, glicose e antibióticos (Quadro 1) ou até a obtenção de um volume final de seis mililitros. O sêmen diluído foi dividido em duas partes iguais e o volume de cada uma das partes foi corrigido com o mesmo diluidor para 6 ml, nos dois tubos de vidro (T₁ e T₂), os quais foram imediatamente incubados no contêiner de transporte para resfriamento, com sistema de troca térmica que permite um ritmo preciso de declínio da temperatura, de 37° a 4°C em 10 horas. Antes da diluição das amostras o pH do meio extensor foi verificado e corrigido, quando necessário, com a solução tampão apresentada no Quadro 1.

Quadro 1: Composição das soluções utilizadas para a manutenção do sêmen canino resfriado a 4°C, durante 24 e 48h em contêiner, para transporte a longa distância

Solução Tampão	Meio Extensor®
50 ml H ₂ O bidestilada, deionizada e autoclavada	920 ml de H ₂ O bidestilada, deionizada e autoclavada
03,75 g bicarbonato de sódio ¹	47 g destrose anidra em pó, ² homogeneizar
Homogeneizar e reservar	24 g leite desnatado em pó, ³ homogeneizar
Após o preparo do meio extensor, dividir o conteúdo em tubos com 5 ml e estocar no freezer a -20°C até a utilização.	500 mg sulfato de amicacina, ⁴ homogeneizar
	Ajustar o pH para 6,5 com a solução tampão

®Reprocenter; ¹ Bicarbonato de Sódio, Farmos Ltda, Rio de Janeiro – Brasil; ² Glicose, Farmos Ltda, Rio de Janeiro – Brasil; ³ Molico, Nestlé, São Paulo – Brasil; ⁴ Novamin, Bristol-Myerf Squipb, São Paulo – Brasil.

Os ejaculados foram considerados para análise a fresco (controle - grupo 1) e mais em três momentos após a diluição: ainda a 37°C (0h - grupo 2) e com 24 e 48 horas de resfriamento (grupos 2 e 3, respectivamente). Os dados foram avaliados por método não-paramétrico (ANOVA - SAS) com obtenção das médias e dos desvios-padrão dos valores obtidos, de acordo com os tempos de permanência do sêmen diluído na refrigeração, para a determinação da significância estatística (p < 0,05).

Resultados e discussão

Os resultados deste trabalho (Tabela 1) suportam as observações prévias de que é viável a manutenção do sêmen canino, diluído em meio extensor à base de leite desnatado, glicose e antibiótico, mantido a 4°C por um período de 48 horas, sem comprometer a capacidade fecundante dos espermatozoides. O efeito grupo mostrou-se significativo para a qualidade da amostra, com relação à diminuição gradual da motilidade progressiva e do vigor espermático, de acordo com o delineamento experimental.

O volume da fração espermática dos ejaculados utilizados não foi objeto de avaliação, como em outros estudos (England e Ponzio, 1996; Farstad, 1996; Paulenz, 1993), onde as três frações foram coletadas integralmente. Não foi observada nenhuma influência negativa da fração prostática eventualmente recolhida, na qualidade do sêmen ou nos resultados iniciais, devido ao uso imediato do diluidor, no máximo até 10 minutos após a colheita, com atuação semelhante à observada por outros pesquisadores (Rota et al., 1995; Cunha e Lopes, 1997; Pereira et al., 1999). A cor branco opalescente foi uma constante em sete dos 10 ejaculados, que variaram de denso a semidenso e diretamente proporcional à concentração espermática (117,1±10,39 x10⁶/ml), o que caracterizou a boa qualidade das amostras avaliadas, semelhantes às de Santos e Almeida (1999). A motilidade média inicial observada no experimento e o vigor espermático, imediatamente após a colheita, também apresentou valores superiores aos encontrados por Cunha e Lopes (1997), Moura et al. (1999), porém inferiores aos de Pereira et al. (1999).

Em relação à morfologia e aos totais de espermatozoides vivos, os resultados dos grupos encontram-se dentro dos parâmetros normais para a espécie canina (Feldman e Nelson, 1996). Quanto às alterações da morfologia espermática, não foram constatadas diferenças relativas à porcentagem de defeitos maiores e menores, entre as avaliações iniciais e após 24 horas de refrigeração

(p>0,05); são danos celulares que ocorrem durante a dimi-

¹ Hamilton Thorm Equitainer®, Massachusetts, USA.

nuição da temperatura por um período prolongado de tempo (Paulenz, 1993; Farstad, 1996) e não interferiram com a qualidade do sêmen no experimento.

Tabela 1: Médias aritméticas e desvios-padrão ($\bar{x} \pm s$) em amostras de sêmen canino, segundo a caracterização dos grupos e os parâmetros avaliados

Grupos (n=10)	Motilidade (%)	Viçor (0-5)	Total Sptz vivos (%)
1 (fresco)	86,5 ($\pm 1,88$)	4,5 ($\pm 0,22$)	91,7 ($\pm 0,45$)
2 (0h p.d.)	86,5a ($\pm 1,88$)	4,4 ($\pm 0,22$)	91,7a ($\pm 0,45$)
3 (24h)	79b ($\pm 3,16$)	4,3 ($\pm 0,28$)	86,9a ($\pm 0,94$)
4 (48h)	73c ($\pm 4,63$)	4,2 ($\pm 0,31$)	79,7b ($\pm 1,81$)

Fonte: Faculdade de Veterinária-UFF

p.d. = pós-diluição a 37°C;

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Ao avaliar-se o comportamento das variáveis apresentadas na Tabela 1, observou-se que no resfriamento apesar de não haver diferença entre os grupos 2 e 3 para vigor e o total de espermatozoides vivos, a motilidade apresentou um declínio significativo ($p < 0,05$). Esta condição, inerente ao processo de refrigeração do sêmen, diluído em meio com leite desna-

tado, glicose e antibiótico, é compatível com a manutenção da grande porcentagem de espermatozoides vivos, corrobora com as conclusões de outros estudos, de que o sêmen diluído refrigerado tem um período de sobrevivência curto, mas

suficiente para manter sua fertilidade até 72 horas (Almeida, 1997; Cunha e Lopes, 1997; Farstad, 1996; Threlfall, 1996; Rota, 1995). Com o aumento do tempo de permanência no resfriamento, nas 48 horas (grupo 4) somente a variável vigor continuou a manter-se praticamente com a mesma intensidade, pois assumiu uma linha de diminuição menos acentuada, sem valores significativos, semelhante a outras observações anteriores (Paulenz, 1993; Farstad, 1996; Moura et al., 1999; Pereira et al., 1999). Na composição energética do meio extensor está a grande vantagem deste diluidor, que fornece substrato para a manutenção do vigor e da motilidade progressiva, capaz de permitir aos espermatozoides atingirem os seus alvos.

Conclusões

Nas condições deste experimento foi possível concluir-se que: o diluidor utilizado foi eficaz na manutenção da qualidade espermática, de sêmen canino resfriado a 4°C em contêiner para transporte e que, pelas facilidades oferecidas em seu preparo e utilização, pode proporcionar ao médico-veterinário o envio de sêmen a distâncias, com até 48 horas para chegar.

Referências

ALMEIDA, L.E.F. *Viabilidade Espermática de Sêmen Canino Refrigerado a 4°C, durante 24 e 48 horas em Container para Transporte*. Faculdade de Veterinária da UFF, Niterói, 1997, 69 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 1997.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M.D. Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluidores à base de leite e glicina gema. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21, n. 2, p. 68-71, 1977.

ENGLAND, C. G.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-tawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriog.*, v. 46, n. 2, p. 165-171, 1996.

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

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996, 487 p.

GÜNZEL-APEL, A. R. *Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund*. Hannover: Gustav Fischer Verlag Jena, 1994, p. 20-84.

HARROP, A.E. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Vet. Rec.*, v. 110, p. 194-196, 1954.

MOURA, C.S.; CAVALCANTI, M.C.O.; GUERRA, M.M.P.; TAVARES, P.T.S. Criopreservação de sêmen canino utilizando diferentes métodos de refrigeração. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 23, n. 3, p. 304-306, 1999.

PAULENZ, H. Spermimembranes struktur og funksjon i relasjon til kudesjokk. *Norw. J. Vet. Med.*, v.105, p. 1135-1142, 1993.

PEREIRA, B.S.; UCHOA, D.C.; CORTEZ, A.A.; et al. Conservação do sêmen canino a 4°C com dois diluentes. CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 4. Pernambuco, 1999. *Anais*, Pernambuco, 1999, p. 284.

SANTOS, M.R.C.; ALMEIDA, L.E.F. Sperm viability of the canine cryopreserved semen at 5°C, during 24 and 48 hours in a transport container. W. Vet. Congr., 26, Lyon, 1999. *Anais*, Lyon, 1999, p. CD.

ROTA, A.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extensors on canine semen stored at 4°C. *Theriog.*, v. 44, p. 886-900, 1995.

THRELFALL, W. R. *Semen Collections and semen shipment, in: Canine Reproduction Short Course*. Theriogenology, Ohio State University, 1996, 42 p.