

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Daniel Couto Uchoa

**Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluidores à
base de água de coco**

Fortaleza, Ceará
Dezembro de 2004

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

**Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluidores à base de
água de coco**

Daniel Couto Uchoa
Aprovada em 17/12/2004
Banca examinadora

Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva
Orientadora

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo
Co-Orientador-Examinador

Profa. Dra. Maria Denise Lopes
Examinadora

Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
Examinadora

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Daniel Couto Uchoa

**Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluidores à
base de água de coco**

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 de Concentração: Reprodução e Sanidade de Carnívoros, Onívoros e Aves.

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

Fortaleza, Ceará
Dezembro de 2004

U17i Uchoa, Daniel Couto.

Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco diluído com um meio de conservação à base de água de coco/ Daniel Couto Uchoa. – Fortaleza, 2004.

61p.; il.

Orientadora: Profa. Lúcia Daniel Machado da Silva.

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

1. Cães. 2. Inseminação artificial. 3. Água de coco. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.7

AGRADECIMENTOS

Aos grandes homens de minha vida, meus heróis: meu pai (Raimundo Uchoa) e meu grande avô Candido Couto. Às minhas heroínas: minha mãe Vera Couto Uchoa e minha maravilhosa avó Luiza Couto. Ao paraíso chamado de Fazenda Canafistula, onde passei os melhores momentos de minha infância e adolescência junto ao meu avô. Aos meus irmãos Alexandre, Felipe e Aderson Couto Uchoa e meu querido sobrinho Enzo William Pearce Uchoa por tudo que vocês significam pra min.

Ao grande amor da minha vida, minha amiga, noiva e futura esposa Ticiania Franco Pereira da Silva.

A minha “Chefinha” (Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva) pela amizade e ensinamentos sendo uma verdadeira fonte de inspiração e boa vontade.

A todos os meus colegas de laboratório e principalmente àqueles que me receberam em janeiro de 1998 (Alexandre Rodrigues Silva e Rita de Cássia Soares Cardoso) quando lá cheguei e que muito me ensinaram e ainda muito me ensinam.

Aos meus maravilhosos cães Boxers que passaram pela minha vida: Fetiche (minha primeira Boxer), Mago, Rico, Skyler, Adam e Savannah. Aos meus grandes amigos que convivem comigo Don Pepe, Taco, Adrian, Taylor e aos filhotes Baco e Lara.

A todos os canis particulares, em especial Grande Canafistula, Uchoa’s Kennel e Ripped Dog que muito contribuíram para realização deste trabalho.

À Clínica Vet Center na pessoa dos proprietários Dra. Ana Kátia Rabelo e Abelardo Ribeiro Júnior, pelo cuidado e atenção com nossos cães, além da grande amizade. À Veter Centro de Diagnóstico por Imagem, na pessoa da Dra. Lucilma Gurgel Leite, pela realização das ultrassonografias dos animais experimentais e pelo apoio, carinho e amizade.

Aos colegas de mestrado pelo convívio maravilhoso e saudável que tivemos.

Aos membros da banca de avaliação: Dra. Maria Denise Lopes (UNESP), Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, Dr. José Ferreira Nunes pelas críticas e sugestões à esta dissertação. Em especial, ao Dr. Airton Alencar de Araújo, por sua amizade e apoio, e também, pela gentileza em várias vezes receber-me em sua casa para realizar a estatística e correção deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

RESUMO

A inseminação artificial é uma importante ferramenta quando da impossibilidade do acasalamento entre casais de cães saudáveis. No entanto, para a inseminação com sêmen a fresco é necessário que se obtenha um volume mínimo inseminante. Os diluidores à base de água de coco aparecem como importante alternativa para inseminação artificial com sêmen a fresco. Este trabalho teve como objetivo testar os diluidores à base de água de coco na inseminação artificial em cães, comparando as taxas de parição, prolificidade e a proporção sexual das crias. Para tanto, foram utilizadas fêmeas das raças Rottweiler, American Pit Bull Terrier, Boxer e Labrador divididas em dois grupos aleatoriamente. No grupo 1, 68 cadelas foram inseminadas com diluidor à base água de coco, no grupo 2, 67 cadelas, foram inseminadas com diluidor à base de água de coco em pó. As taxas de parição obtidas foram de 97% (grupo 1) e 91% (grupo 2) e a prolificidade foi de $8,21 \pm 0,38$ (grupo 1) e $7,12 \pm 0,43$ (grupo 2), não havendo diferença significativa entre os grupos para estes parâmetros. Já a proporção sexual obtida, foi de 66,30% (grupo 1) e 64,34% (grupo 2) de fêmeas, mostrando estes valores uma superioridade no número de fêmeas quando comparada aos machos. Pode-se então concluir que os diluidores à base de água de coco apresentam-se como excelente alternativa para inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco, pois apresentam taxas de parição e prolificidade semelhantes à monta natural, além de favorecer o nascimento de um maior número de fêmeas em relação ao de machos por ninhada.

ABSTRACT

Artificial insemination is an important tool when of the impossibility of the mating among couples of healthy dogs. However for the insemination with fresh semen is necessary to have a minimum volume to inseminate. The extenders based on coconut water appear as an important alternative for artificial insemination with fresh semen. This work aimed to test the extenders based on coconut water in the artificial insemination in dogs, comparing the parturition rate, prolificity and sexual proportion of the litter. For so much, Rottweiler, American Pit Bull Terrier, Boxer and Labrador bitches were used and divided in two groups. Group 1 (68 bitches) was inseminated with coconut water extender and group 2 (67 bitches) with extender based on powder coconut water. Bitches obtained a parturition rate of 97% and 91%, respectively for groups 1 and 2, prolificity of 8.21 ± 0.38 (group 1) and 7.12 ± 0.43 (group 2), with no significant difference for these parameters. On the other hand, the sexual proportion was of 66.30% of females in the group 1 and 64.34% in group 2. These values showed superiority in the number of females when compared to the males. From these data, we can conclude that the extenders based on coconut water are an excellent alternative for artificial insemination in dogs with fresh semen, because they present a parturition rate and prolificity similar to natural breeding. Moreover, these extenders favorate the birth of a larger number of females in relation to males per litter.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	i
Lista de Ilustrações.....	ii
Introdução.....	01
Revisão de Literatura.....	03
1.A cadela.....	03
1.1.Puberdade.....	03
1.2. Ciclo Estral.....	03
1.2.1. Anestro.....	03
1.2.2. Pró-Estro.....	04
1.2.3. Estro.....	04
1.2.4. Diestro.....	05
1.3. Monitoramento do Ciclo Estral.....	05
1.3.1. Vaginoscopia.....	06
1.3.2. Dosagem Hormonal.....	06
1.3.3. Citologia Vaginal.....	06
2. O cão.....	07
2.1.Exame clínico-reprodutivo.....	07
2.2. Coleta e avaliação do sêmen.....	07
3. Inseminação Artificial.....	10
3. 1. Histórico da Inseminação Artificial na espécie canina.....	10
3. 2. Tipos de Inseminação Artificial.....	11
4. Diluentes.....	12
4. 1. A água de Coco.....	13
5. Avaliação da Função Espermática.....	14
Justificativa.....	16
Objetivos.....	17
Objetivo Geral.....	17
Objetivos Específicos.....	17
Material e Métodos.....	18

1. Animais.....	18
2. Coleta de Sêmen.....	18
3. Preparo do Diluidor.....	19
4. Inseminação Artificial.....	19
5. Análise Estatística.....	20
Resultados e Discussão.....	23
Conclusões.....	36
Perspectivas.....	37
Referências Bibliográficas.....	38
Anexos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP:	água de coco em pó
DBAC:	diluidor à base de água de coco
ACP-106 [®] :	meio de conservação de espermatozóides de canídeos à base de água de coco em pó
ELISA:	<i>enzyme linked immuno-sorbent assay</i> (ensaio de imunoadsorção enzimático)
IA:	inseminação artificial
IAIU:	inseminação artificial intra-uterina
IAIV:	inseminação artificial intra-vaginal
IU:	intra-uterina
IV:	intra-vaginal
LH:	hormônio luteinizante
MN:	monta natural
mOsm/L	osmolaridade por litro
P ₄	progesterona
pH	potencial hidrogeniônico

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA. 1: Monta natural na espécie canina. A: aproximação do macho e lateralização da cauda da cadela. B: monta.	Pág. 04
FIGURA. 2: Frações do ejaculado canino. A: 1ª Fração ou fração prostática. B: 2ª Fração ou fração espermática. C: 3ª Fração ou Fração Prostática.	07
FIGURA. 3: Coleta de sêmen na espécie canina. A: Manipulação peniana através do prepúcio. B: Início da ereção peniana. C: Pênis com irrigação sanguínea e ereção moderada. D: Pênis com irrigação sanguínea e ereção completa. E: Gotejamento da fração espermática em tubo graduado.	08
FIGURA 4: Sonda de Osiris com balão insulflado acoplado a seringa.	11
FIGURA 5: Inseminação artificial. A: abertura da vulva. B: Introdução da sonda de Osiris. C: Elevação do trem posterior da cadela e influxo seminal. D: Refluxo seminal.	19
FIGURA 6: Cadela do grupo 1 aos 50 dias de gestação após inseminação artificial.	19
QUADRO 1: Escala utilizada para classificar o vigor do sêmen canino.	09
QUADRO 2: Composição da água de coco anão maduro.	14
TABELA 1: Média e erro padrão da idade em meses das fêmeas utilizadas para inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106® - Grupo 2) e seus respectivos controles por MN na raça American PitBull Terrier de acordo com as variáveis de idade (meses), intervalo (dias) do 1º dia de secreção serosanguinolenta ao 1º dia da MN ou IA ([] proestro-	20

estro) e taxa de queratinização (%).

TABELA 2: Média e erro padrão da idade em meses das fêmeas utilizadas para inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106® - Grupo 2) e seus respectivos controles por MN na raça Boxer de acordo com as variáveis de idade (meses), intervalo (dias) do 1º dia de secreção serosanguinolenta ao 1º dia da MN ou IA ([] proestro-estro) e taxa de queratinização (%). 21

TABELA 3: Média e erro padrão da idade em meses das fêmeas utilizadas para inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106® - Grupo 2) e seus respectivos controles por MN na raça Labrador de acordo com as variáveis de idade (meses), intervalo (dias) do 1º dia de secreção serosanguinolenta ao 1º dia da MN ou IA ([] proestro-estro) e taxa de queratinização (%). 21

TABELA 4: Média e erro padrão da idade em meses das fêmeas utilizadas para inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106® - Grupo 2) e seus respectivos controles por MN na raça Rottweiler de acordo com as variáveis de idade (meses), intervalo (dias) do 1º dia de secreção serosanguinolenta ao 1º dia da MN ou IA ([] proestro-estro) e taxa de queratinização (%). 22

TABELA 5: Índice de prolificidade (total e por sexo) após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou meio de conservação de espermatozoides de canídeos à base de água de coco em pó (ACP-106® - Grupo 2) e seus respectivos controles por monta natural (MN). 22

TABELA 6: Taxa de parição e índice de prolificidade após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106® - Grupo 2) e seus respectivos controles por monta natural (MN). 23

TABELA 7: Proporção sexual dos filhotes (machos e fêmeas) nascidos após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106®- Grupo 2) e seus respectivos controles por monta natural (MN). 24

TABELA 8: Média e erro padrão do índice de prolificidade de cada sexo nascidos após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106®- Grupo 2) e seus respectivos controles por MN na raça American PitBull Terrier (MN). 25

TABELA 9: Média e erro padrão do índice de prolificidade de cada sexo nascidos após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC-GRUPO 1) ou água de coco em pó (ACP-106®- GRUPO 2) e seus respectivos controles por monta natural na raça Boxer (MN). 25

TABELA 10: Média e erro padrão do índice de prolificidade de cada sexo nascidos após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- GRUPO 1) ou água de coco em pó (ACP-106®-GRUPO 2) e seus respectivos controles por monta natural na raça Labrador (MN). 26

TABELA 11: Média e erro padrão do índice de prolificidade de cada sexo nascidos após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- GRUPO 1) ou água de coco em pó (ACP-106®- GRUPO 2) e seus respectivos controles por monta natural na raça Rottweiler (MN). 26

Tabela 12: Número e percentual de filhotes nascidos de cada sexo nas raças American Pit Bull Terrier, Boxer, Labrador e Rottweiler registrados no Kennel Club do Estado do Ceará no ano 2000. 27

INTRODUÇÃO

A primeira inseminação artificial (IA) cientificamente registrada foi realizada na espécie canina e descrita por Spallanzani em 1780 em Padova-Itália após 62 dias da IA com o nascimento de 3 filhotes saudáveis (apud BADINAND et al., 1990). Atualmente, esta é uma biotecnologia bastante difundida na reprodução assistida de diversas espécies (FELDMAN & NELSON, 1996). O aumento do interesse por parte dos criadores em incrementar a eficiência reprodutiva de seus animais tem levado a um maior desenvolvimento na criação de cães.

A IA vem tornando-se usual também entre os veterinários que trabalham com melhoramento genético de cães (SILVA et al., 2000; UCHOA et al., 2001, 2002abc). Esta técnica possibilita a eliminação do estresse causado pelo transporte dos animais no momento do acasalamento de casais de cães saudáveis, quando estes se encontram em regiões geograficamente distintas, diminuindo os custos de transporte do material genético; e possibilita a proteção de machos valiosos do risco de doenças sexualmente transmissíveis como herpesvirose, brucelose, micoplasmose e tumor venéreo transmissível. A IA é frequentemente utilizada nos casos de não reconhecimento do macho pela fêmea, ou vice-versa, e nos casos de agressividade inerente à raça e desproporção sexual do peso. Pode-se ainda usar a IA a fim de diminuir a consangüinidade e taras hereditárias, ou nos casos de ejaculação precoce de animais jovens ou idosos. A IA permite otimizar o sêmen de um reprodutor para diversas fêmeas e perpetuar o material genético de animais de alto valor afetivo ou zootecnicamente superiores, assim como de canídeos selvagens (UCHOA et al., 2001; UCHOA et al., 2002bc; SILVA et al., 2003).

Paralelamente ao uso da IA, diversos diluidores vêm sendo testados *in vitro* e *in vivo*. Durante a coleta do sêmen, o animal pode inibir-se e não fornecer um volume mínimo inseminante, tendo que este ser acrescido de um diluidor para realização da IA (DAVOL, 2001). Nos últimos anos, vários diluidores têm sido utilizados para obtenção de um volume mínimo inseminante, tais como: o líquido prostático autólogo (UCHOA et al., 2001, 2002c), a solução salina fisiológica (UCHOA et al., 2002b), o leite desnatado (BETINE et al., 2001) e o tris (UCHOA et al., 2001; SILVA et al., 2002).

Como alternativa aos diluidores convencionais, o diluidor à base de água de coco

(DBAC) já foi utilizado *in vivo* com bastante sucesso em capotes (MILITÃO et al., 1994), caprinos (OLIVEIRA et al., 1994), ovinos (NUNES, 1986) e suínos (TONIOLLI & MESQUITA, 1990). Em cães, já foi testada *in vitro* apresentando bons resultados para congelamento (CARDOSO et al., 1998, CARDOSO, 2001 e CARDOSO et al., 2002), resfriamento (PEREIRA et al., 1999; FONTENELE et al., 2002) e termoresistência (UCHOA et al., 2002a); e *in vivo* para IA em diversas raças (PEREIRA et al., 2001; SILVA et al., 2001; UCHOA et al., 2002ab, 2003). Além disto, resultados de IA em caprinos sugerem que o DBAC proporciona o nascimento de mais filhotes do sexo feminino (NUNES, 1986; SALLES, 1989).

Entretanto, a utilização da água de coco como diluidor de sêmen enfrenta algumas dificuldades de ordem prática, tais como a disponibilidade de frutos com características ideais (fruto com 6 meses de maturação) e a impossibilidade de armazenamento do produto. Desse modo, SALGUEIRO et al. (2002) desenvolveram, através de um processo de pulverização a seco (*Spray Dryer*), a água de coco padronizada na forma de pó (ACP®), permitindo a conservação das suas características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se dispõe do fruto. A fim de comprovar a eficiência do meio de conservação de espermatozóides de canídeos à base de água de coco em pó (ACP-106®), esta solução foi testada na espécie canina *in vitro* por CARDOSO et al. (2003 e 2004) e SILVA et al. (2004a). Testes *in vitro* também foram realizados para o sêmen de caprinos (SALGUEIRO et al., 2002), ovinos (BRAZ et al., 2003) e eqüinos (SAMPAIO NETO et al., 2002), e *in vivo* para caprinos (SALGUEIRO et al., 2002) e ovinos (SALGUEIRO et al., 2004).

O uso do DBAC e do ACP-106® pode representar uma excelente alternativa para a massificação da biotecnologia de IA, visando o melhoramento genético canino. Além disso, esse método de diluição de sêmen poderá futuramente ser aplicado em espécies caníneas ameaçadas de extinção que necessitem de melhores taxas de gestação e prolificidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi testar o DBAC e o ACP-106®, na IA a fresco por via intravaginal em cães comparando as taxas de parição, prolificidade e proporção sexual das crias.

REVISÃO DE LITERATURA

1. A cadela

1.1. Puberdade

A puberdade na cadela coincide com o aparecimento do primeiro ciclo estral da mesma podendo variar do 6º ao 24º mês de vida, estando esta grande variação relacionada a fatores raciais, a determinadas linhagens e a características individuais (SORRIBAS, 1995; SIMPSON et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001).

1.2. Ciclo Estral

O ciclo estral da cadela pode ser dividido em quatro fases bem distintas: o anestro (período de inatividade sexual), seguido de pró-estro, estro, diestro, seguido novamente de um anestro (SORRIBAS, 1995; SIMPSON et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001).

1.2.1 Anestro

Tem duração bastante variável de 2 a 10 meses (média de 4 meses). A cadela não manifesta comportamento sexual, não tendo nenhuma alteração de comportamento, nem tão pouco de sua genitália. Segundo JOHNSTON et al. (2001) nesta fase os esteróides ovarianos encontram-se de forma basal. Citologicamente o anestro é caracterizado por apresentar poucas células ao esfregaço vaginal sendo observadas algumas parabasais e grandes intermediárias (SIMPSON et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001).

1.2.2. Pró-estro

Tem duração de 3 a 21 dias (média de 9 dias). A cadela atrai o macho, aceita a corte, sem permitir a monta. Sua vulva encontra-se bastante entumecida e esta apresenta uma secreção vaginal sero-sanguinolenta (SILVA et al., 2003). Hormonalmente, há um crescente aumento do estrógeno. Citologicamente, o início do pró-estro é caracterizado por um grande número de células basais, parabasais, neutrófilos e um grande número de hemácias. Com a aproximação do estro passa-se a observar uma grande mudança no perfil citológico com a presença de pelo menos 70% de células superficiais queratinizadas nucleadas ou não nucleadas, grandes intermediárias e poucas células basais e parabasais que caracterizavam o início do pró-estro (SORRIBAS, 1995; SIMPSON et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001; SILVA et al., 2003).

1.2.3. Estro

Com uma duração de 3 a 21 dias (média de 9 dias). A cadela atrai o macho, aceita a corte e permite a cópula. Nesse período a vulva apresenta uma consistência mais suave, assim como uma secreção vaginal mais fluida. A fêmea permanece imóvel, exibindo a vulva e lateralizando a cauda (**FIGURA 1-** UCHOA et al., 2001; SILVA et al., 2003). Hormonalmente, é caracterizado com o pico de LH, a elevação e queda do estrógeno e um aumento dos níveis de progesterona. Citologicamente é caracterizado por apresentar mais de 70% células superficiais queratinizadas com a presença de núcleos picnóticos ou com a ausência dos mesmos e algumas grandes intermediárias (UCHOA et al., 2001). Não são observadas células basais ou parabasais (SORRIBAS, 1995; SIMPSON et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001).



Figura 1: Monta natural na espécie canina. A: aproximação do macho e lateralização da cauda da cadela. B: monta.

1.2.4. Diestro

A duração desta fase é de 60 a 100 dias (SIMPSON et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001). Nos primeiros 15 dias do diestro (JÖCHLE & ANDERSEN, 1977 apud RODRIGUES & RODRIGUES, 2002). Se a cadela estiver gestante, o entumescimento volta a aparecer a partir do 45º dia. Não ocorre secreção vaginal, a fêmea não atrai os machos. Hormonalmente, é caracterizado pela grande elevação da progesterona e declínio do estrógeno. Citologicamente começa a ocorrer uma reversão com a ausência de células superficiais e grande predominância de parabasais e intermedirias, assim como estrias de muco e neutrófilos (SORRIBAS, 1995; SIMPSON et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001).

1.3. Monitoramento do ciclo estral

Para o monitoramento do ciclo estral da cadela os exames mais comumente utilizados são a vaginoscopia, dosagem hormonal e citologia vaginal (SIMPSON et al., 1998).

1.3.1. Vaginoscopia

Técnica que consiste na visualização da mucosa vaginal, utilizando-se um vaginoscópio que permite a abertura dos lábios vulvares podendo assim verificar o grau de crenação da mucosa vaginal que deve apresentar-se com pregas bem angulosas e com aspecto bem pálido. Esta técnica tem como inconveniente o desconforto que causa ao animal dificultando a realização do mesmo (LINDSAY, 1983; SIMPSON et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001).

1.3.2. Dosagem Hormonal

A dosagem de progesterona (P_4) plasmática pode ser mensurada através de Radioimunoensaio ou ELISA. O momento ideal para realização da inseminação artificial, segundo JOHNSTON et al. (2001) e SIMPSON et al. (1998) é quando os níveis de P_4 plasmática estão entre 4 e 10 ng/mL.

1.3.3. Citologia Vaginal

Baseia-se na mudança do perfil citológico da cadela, o qual sofre mudança de acordo com a fase do ciclo estral. A inseminação deve ser realizada quando se atinge um perfil mínimo de 70% de células queratinizadas. Trata-se de uma técnica simples, rápida e de baixo custo, tendo uma eficiência em torno de 80%. A citologia permite aferir a função folicular de forma indireta. Esta técnica é recomendável quando se trabalha com inseminação artificial com sêmen a fresco ou refrigerado (SIMPSON et al., 1998; UCHOA et al., 2001; JOHNSTON et al., 2001; SILVA et al., 2003).

2. O cão

2.1. Exame clínico-reprodutivo

Previamente à coleta de sêmen, deve-se realizar uma anamnese detalhada do reprodutor, desde um minucioso exame clínico (se o cão esteve enfermo recentemente e que drogas ele utilizou), realizando posteriormente um exame andrológico, iniciando com um breve histórico reprodutivo e com posterior inspeção dos testículos que devem apresentar-se soltos no saco escrotal, ter forma ovóide, tamanho normal para raça e idade, ter consistência intermediária e serem simétricos. Deve-se observar também o pênis do cão se este não apresenta nenhuma má formação (SIMPSON et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001; SILVA et al., 2002).

2.2. Coleta e avaliação do sêmen

Após a realização de um rigoroso exame clínico-reprodutivo, pode-se realizar a coleta. O ejaculado canino apresenta como particularidade ser dividido em três frações distintas (**FIGURA 2**), sendo a 1ª e a 3ª de origem prostática na qual a primeira tem por função limpar o ducto uretral de resquícios de urina e a terceira tem o maior volume e a função de carrear os espermatozoides para o útero, sendo este o diluidor natural dos cães. Por fim, a 2ª fração ou fração espermática, esta de origem testicular é rica em espermatozoides e sua coloração varia do turvo ao leitoso de acordo com a concentração espermática (ENGLAND & ALLEN, 1992; CHRITIENSEN, 1988; SIMPSON et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001).

Dentre as principais formas de coleta do sêmen canino, podemos citar a vagina artificial, a eletroejaculação e a manipulação digital. Dentre essas, a melhor forma de coleta e a mais usual é a da manipulação digital, pois permite uma obtenção de um ejaculado de forma mais rápida e de melhor qualidade. A manipulação digital consiste em massagear o bulbo cavernoso do animal até que este entre em ereção parcial, momento em que o prepúcio deve ser retraído para trás do bulbo e o cão entre em ereção completa. O ejaculado é coletado com a ajuda de funil e tubos graduados de vidro ou plástico, tendo-se o cuidado para que durante a coleta o cão não tenha sua atenção desviada, e evitando possíveis traumas do pênis do cão com o funil (**FIGURA 3** -SIMPSON et al., 1998; SILVA et al., 2003). Ao avaliar o sêmen canino deve-se observar o volume, coloração, viscosidade, osmolaridade e pH e microscopicamente a concentração espermática, morfologia bem como o parâmetro mais rotineiramente utilizado para a avaliação do sêmen que é a motilidade espermática, que deve ter um valor mínimo de 70% (CHRISTIANSEN, 1988). A proporção de espermatozóides exibindo uma motilidade progressiva é geralmente estimada subjetivamente em microscópio óptico, de contraste de fase ou, mais objetivamente, utilizando-se a análise computadorizada (STRÖM-HOLST, 1999). O *status* da motilidade ou vigor espermático é a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozóides e deve apresentar um vigor de pelo menos 3 (progressão moderada para frente). Para tanto, faz-se uso de uma escala que vai de 0 a 5 (**QUADRO 1**).

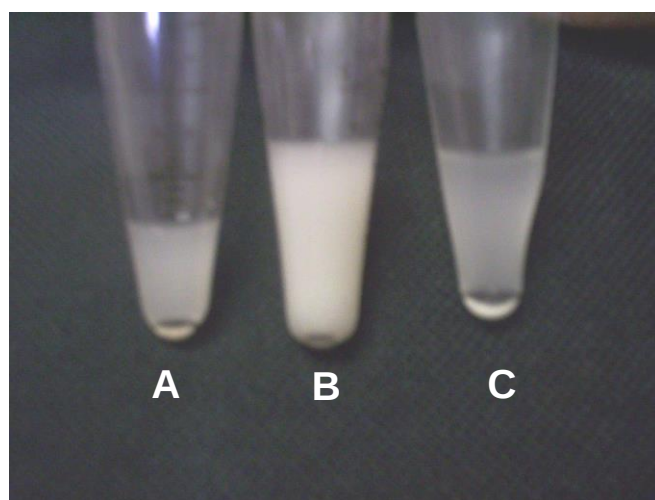
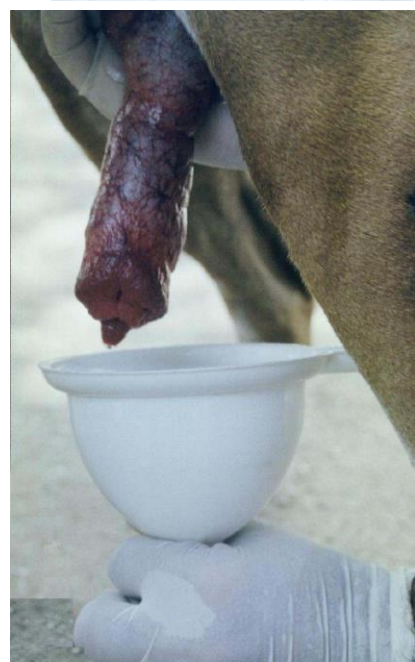
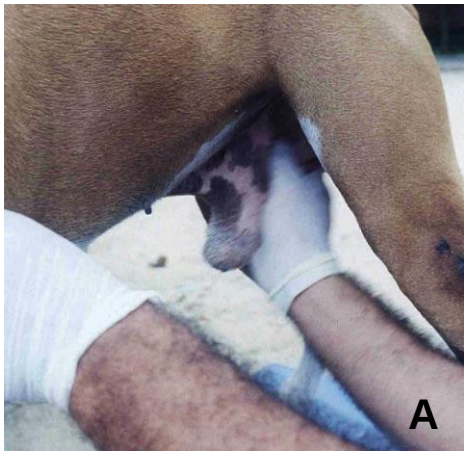


FIGURA 2: Frações do ejaculado canino. A: 1ª fração ou fração prostática. B: 2ª fração ou ração espermática. C: 3ª fração ou fração prostática.



QUADRO 1: Escala utilizada para classificar o vigor do sêmen canino.

Escala (0-5)	Classificação correspondente
0	Todos os espermatozóides sem movimento.
1	Movimentos lentos látero-laterais, sem progressão.
2	Rápidos movimentos látero-laterais, sem progressão.
3	Rápidos movimentos látero-laterais, com ocasional progressão.
4	Lenta e contínua progressão.
5	Rápida e contínua progressão.

*Fonte: CHRISTANSEN (1988).

3. Inseminação Artificial

3.1. Histórico da inseminação artificial na espécie canina

A tecnologia de reprodução assistida em cães teve início no século XVIII. Spallanzani, em 1776 (*apud* WATSON, 1979), foi o primeiro a registrar que uma diminuição na temperatura proporcionava uma redução, de forma reversível, na atividade metabólica do espermatozóide, permitindo assim o seu armazenamento. A primeira inseminação artificial (IA), cientificamente registrada, foi realizada na espécie canina e descrita por Spallanzani em 1780 (*apud* BADINAND et al., 1990).

O progresso nessa área tem sido lento, incluindo o desenvolvimento de equipamentos para IA, bem como de métodos para preservação do sêmen fresco, resfriado e congelado. Entretanto, as pesquisas direcionadas para a espécie canina eram raras até bem pouco tempo, situação esta que vem sendo revertida devido a um interesse cada vez maior sobre o animais de companhia, com as pesquisas voltadas para os mesmos aumentando significativamente nos últimos anos (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989).

3.2. Tipos de Inseminação Artificial

Para a realização da inseminação artificial na cadela, já foram descritas algumas técnicas, onde o sêmen pode ser depositado na vagina (via intravaginal – IV) ou diretamente no útero (via intrauterina – IU), por diferentes meios.

A inseminação artificial intravaginal (IAIV) é a via de escolha na maioria dos casos, por ser de fácil execução e por oferecer bons resultados de um modo geral. Para a IAIV pode-se utilizar uma sonda rígida de plástico, fazendo-se a deposição do sêmen ao longo da vagina da cadela (SEAGER & PLATZ, 1977), ou a sonda de Osíris (MIALOT et al., 1985; UCHOA et al., 2002bc; SILVA et al., 2003).

A sonda de Osíris é uma pipeta plástica flexível munida de um pequeno balão inflável na sua extremidade distal, a fim de se evitar o refluxo do sêmen (**FIGURA 4**). Em virtude de sua anatomia, esta tem sua penetração facilitada no trato genital da cadela, além de estimular o peristaltismo vaginal, tal qual ocorre no coito. Essa sonda possui orifícios na sua extremidade distal, facilitando a aspersão do sêmen diretamente na porção cranial da vagina (MIALOT et al., 1985; SILVA & VERSTEGEN, 1995; UCHOA et al., 2002bc). Na Europa, o uso desta sonda especialmente desenvolvida para espécie canina é bem difundida (UCHOA et al., 2001)

No protocolo clássico de IAIV, recomenda-se a elevação do trem posterior da cadela por períodos que variam em torno de 15 minutos, visando-se evitar o refluxo do sêmen (SEAGER, 1986; SILVA et al., 1996).

A inseminação artificial por via intrauterina (IAIU) fica reservada para casos particulares, onde a via vaginal poderia comprometer os resultados da IA, como, por exemplo, na utilização de um sêmen congelado com baixa qualidade pós-descongelamento (SILVA et al., 1996).

A IAIU por via transcervical não é uma técnica fácil de ser executada e, para realização desta técnica o inseminador deve ter muita destreza em virtude da anatomia da cervix da cadela e do incômodo que a mesma causa, em alguns casos, a tranquilização do animal pode ser necessária (SILVA et al., 2003).

A IAIU por laparotomia foi desenvolvida, no sentido de contornar as dificuldades do cateterismo cervical. No entanto, essa técnica comporta uma intervenção cirúrgica com todos os riscos implícitos (TSUTSUI, 1989).

A IAIU por laparoscopia, apesar de também ser uma técnica cirúrgica, tem caráter pouco invasivo e é de rápida execução (SILVA et al., 1995), uma vez que o sêmen pode ser depositado em apenas um corno uterino, haja vista que os espermatozoides rapidamente migram para o outro corno (TSUTSUI, 1989).



4. Diluente

Um bom diluente caracteriza-se pela ausência de toxicidade à célula espermática, isotonicidade, poder nutritivo e tamponante eficaz, ação estabilizadora de membrana, potencial hidrogeniônico (pH) que favoreça a sobrevivência espermática e ainda, ser de fácil preparo e baixo custo (FONTBONNE, 1993).

Nos últimos anos, vários diluentes têm sido utilizados para obtenção de um volume mínimo inseminante, tais como: o líquido prostático autólogo (UCHOA et al., 2001, 2002c), a solução salina fisiológica (UCHOA et al., 2002b), o leite desnatado (BETINE et al., 2001) e a própria solução à base de água de coco (PEREIRA et al., 2001; UCHOA et al., 2002ab), dentre outros.

Alguns experimentos foram realizados utilizando-se a água de coco como diluente do sêmen canino para testes de termorresistência (UCHOA et al., 2002, 2003) e para a conservação por resfriamento (PEREIRA *et al.*, 1999) e congelação (CARDOSO *et al.*, 1998, 2001 e 2002), onde este diluente proporcionou bons resultados.

4.1. A Água de Coco

A água proveniente do fruto (*Cocos nucifera* L.), que pertence à subfamília *Cocosidea* da família *Palmea*, é uma solução estéril, ligeiramente ácida, contendo proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento (fitohormônios) e pobre em fosfolipídios (LAGUNA, 1996). A água de coco contém ainda outros compostos que mostram atividades semelhantes às das citocininas e que são derivados das purinas, possuindo atividades fisiológicas como a floração, expressão sexual e formação de frutos, consideradas excelentes para as células (NUNES & SALGUEIRO, 1999). O isolamento de uma citocinina na água de coco foi realizado por LETHAM (1974). Depois de várias pesquisas, verificou-se que a auxina principal era o ácido 3-indol-acético (LETHAM, 1974). NUNES & COMBARNOUS (1995) também isolaram essa substância da água de coco, verificando que a mesma apresentava uma ação benéfica sobre a motilidade e a porcentagem de espermatozóides móveis do sêmen caprino e ovino incubado a 37°C.

A água de coco *in natura* proveniente de frutos com idade de seis meses (variedade verde da praia ou anão maduro) apresenta uma osmolaridade em torno de 500 mOsmol/L e um pH de 4,5 a 5,0 (QUADRO 2). Para uma perfeita compatibilização da água de coco com o sêmen canino, deve ser realizada 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 a 2 partes de água de coco, 1 parte de água destilada e 1 parte de solução de citrato de sódio a 5% (NUNES, 1995). No entanto, a utilização da água de coco como diluente de sêmen se depara com algumas dificuldades de ordem prática, tais como a disponibilidade de frutos com características ideais (fruto com 6 meses de maturação) e a impossibilidade de armazenamento do produto. Desse modo, SALGUEIRO *et al.* (2002) desenvolveram um diluente à base de água de coco, sendo este padronizado na forma de pó, recebendo a denominação de ACP-106[®] permitindo a conservação das suas características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se dispõe do fruto. Para a preparação de 100 mL do diluente deve-se acrescentar: ACP-106[®] (12g) + água destilada (50 mL) + solução de citrato de sódio a 1% (50 mL).

De acordo com NUNES (1986, 1987), a fertilidade de cabras inseminadas com sêmen diluído em água de coco é superior a de cabras inseminadas com sêmen diluído em leite desnatado, além de se obter um maior número de crias do sexo feminino (72%). SALLES

(1989) trabalhando com diluidores à base de água de coco obteve um percentual médio de 73,84 % para o nascimento de crias do sexo feminino.

5. Avaliação da função espermática

A alta taxa de fertilidade é o objetivo principal quando se trabalha com IA. Contudo, testes de fertilidade, além de apresentarem um alto custo, têm a desvantagem de mostrarem baixa sensibilidade se a dose inseminante é alta ou poucos animais são usados (TARDIF et al., 1999). Entretanto, rotineiramente, usa-se o método de avaliação clássica que inclui basicamente a análise da motilidade, vigor e morfologia espermática. Pode-se ainda realizar outros testes mais acurados tais como o teste hiposmótico que mede a funcionalidade da membrana plasmática que pode ser observado através do enturgescimento da célula espermática, causando um enrolamento da cauda do espermatozóide. Outra avaliação realizada é a avaliação da integridade acrossomal, na qual deve ser utilizado um corante (ex: clorotetraciclina), para observar se acrossoma está intacto. A reação acrossomal só deve ocorrer no momento da penetração do espermatozóide na zona pelúcida e posterior fusão com a membrana do oócito. O teste de ligação em zona pelúcida e a fertilização *in vitro* parecem ser bem mais precisos para determinar a fertilidade de um reprodutor, contudo os custos para realização destes testes são elevados (COTTORRELO & HENRY, 2002).

Uma vez que muitos dos parâmetros avaliados *in vitro* não são correlacionados com a fertilidade, a IA de um grande número de fêmeas ainda é o teste mais confiável para comparar os métodos de preservação de sêmen (AMANN & HAMMERSTEDT, 1993). Em cães, testes de fertilidade são difíceis de serem realizados devido ao número limitado de cadelas disponíveis e a longa duração do seu ciclo estral. A problemática para o sucesso com a IA está também ligada às dificuldades encontradas concernentes à determinação do momento ideal para inseminação nessa espécie de fisiologia reprodutiva particular (CONCANNON & BATTISTA, 1989).

QUADRO 2: Composição da água de coco anão maduro.

1. Aminoácidos	μ g/ml
Alanina	177,1
Aminobutírico	168,8
Arginina	16,8
Asparagina	10,4
Aspártico	5,4
Fenilalanina	10,2
Glicina	13,9
Glutâmico	78,8
Glutamina	13,4
Histidina, Metionina e Hidroxipolina	Traços
Homoserina	5,2
Leucina	31,7
Lisina	22,5
Prolina	21,6
Serina	65,8
Tirosina	3,1
Treonina	26,3
Valina	15,1
2. Açúcares	
Frutose	8,9
Glicose	2,46
Sacarose	2,51
3. Vitaminas	
Ácido fólico	0,003
Ácido nicotínico	0,64
Ácido pantotéico	0,52
Biotina	0,02
Tiamina e Piridoxina	0,01
4. Minerais	
Cálcio	Traços
Cloro	183,0
Cobre	0,04
Enxofre	24,0
Ferro	0,10
Fósforo	37,0
Magnésio	30,0
Potássio	312,0
Sódio	105,0

*Fonte: NUNES & COMBARNOUS, 1995.

JUSTIFICATIVA

Conforme descrito na revisão de literatura, alguns trabalhos têm demonstrado que a água de coco pode exercer uma ação benéfica sobre os espermatozóides de vários mamíferos domésticos. Entretanto, o número de estudos realizados no sentido de testar a eficiência da água de coco sobre a viabilidade de células germinais (espermatozóides de cão) ainda é escasso.

O uso dos meios diluentes de sêmen de animais domésticos à base de água de coco *in natura* e em pó (ACP 106[®]), pode representar uma excelente alternativa para a massificação da biotecnologia de IA, visando o melhoramento genético canino no Nordeste do Brasil, apresentando ainda uma relação custo-benefício favorável quando comparada aos preços dos diluentes importados, atualmente disponíveis no mercado

A água de coco mostra toda uma riqueza de substâncias que participam inclusive no metabolismo de espermatozóides; sendo desenvolvido, no Nordeste do Brasil, um diluente à base de água de coco para a conservação de sêmen de caprinos (SALLES & NUNES, 1992) e que foi adaptado para a espécie canina (CARDOSO et al., 1998). Na espécie canina, já foram realizados alguns trabalhos *in vitro*, com diluente à base de água de coco, contudo poucos dados (CARDOSO et al., 1998, CARDOSO 2001 e CARDOSO et al., 2002; PEREIRA et al., 1999; UCHOA et al., 2002bc, 2003) são encontrados *in vivo*.

Além disso, esse método de diluição e conservação de sêmen poderá futuramente ser estudado em espécies canídeas ameaçadas de extinção (WILDT et al., 1995) e o conhecimento dos fatores que influenciam o sucesso da IA com um diluente à base de água de coco poderá acelerar a adaptação dessa biotécnica para as espécies selvagens, que necessitam de melhores taxas de gestação e prolificidade, bem como se possível de um maior nascimento do número de fêmeas em relação aos machos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a eficiência do DBAC e do ACP-106[®] na inseminação artificial a fresco na espécie canina.

Objetivos Específicos

1. Observar as taxas de parição e índice prolificidade de cadelas inseminadas com o DBAC e ACP-106[®] e compará-las com as obtidas após a monta natural (MN).
2. Determinar a proporção de machos e fêmeas nascidas após IA com o DBAC e ACP-106[®], e compará-las com a obtida na MN.
3. Comparar os resultados de taxas de parição, índice prolificidade e proporção de machos e fêmeas nascidas após IA com o DBAC e ACP-106[®].

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados 151 cães oriundos de canis particulares, sendo 16 machos de raças American Pit Bull Terrier (n=2), Boxer (n=4), Labrador (n=2), e Rottweiler (n=8), e 135 fêmeas das raças American Pit Bull Terrier (n=26), Boxer (n=32), Labrador (n=21), e Rottweiler (n=56). As fêmeas pesavam de 25 a 40 Kg e os machos de 25 a 60 Kg. Os animais foram mantidos em canis individuais, alimentados duas vezes ao dia com ração comercial e tendo livre acesso à água. Todos os animais foram submetidos a exames clínicos uma vez por mês durante os dois meses antecedentes à IA ou MN, sendo vermifugados, vacinados contra raiva e doenças infecto-contagiosas caninas. Aos sinais clínicos de distúrbios hematodinâmicos (erlichiose e babesiose), os animais suspeitos eram submetidos a hemograma completo para diagnóstico e tratamento prévio a IA ou MN. Animais não responsivos ao tratamento foram descartados antes do início do experimento.

Foi realizada uma pré-seleção dos machos baseados na sua qualidade seminal, com motilidade $\geq 70\%$, vigor ≥ 4 e alterações morfológicas espermáticas $< 15\%$ (UCHOA et al., 2001). Com relação à escolha das fêmeas, foram selecionadas cadelas púberes que já tivessem apresentado um ciclo estral anterior. Estas fêmeas foram divididas em dois grupos: IA com DBAC (n = 68) ou IA com ACP-106[®] (n= 67). Todas as fêmeas foram submetidas previamente à MN com o mesmo macho a ser utilizado para IA no ciclo imediatamente posterior.

2. Coleta do sêmen

O sêmen dos cães foi coletado por manipulação digital com auxílio de tubos graduados acoplados a um funil, sendo o ejaculado obtido na sua forma fracionada (CHRISTIANSEN, 1988). A segunda fração (rica em espermatozóides) foi retida para avaliações *in vitro* macroscópicas (cor, aspecto, viscosidade e volume) e microscópicas

(motilidade, vigor em escala de 0 a 5), com auxílio da microscopia óptica (100X) e para posterior inseminação.

3. Preparo do diluidor

O DBAC foi preparado filtrando-se em papel filtro a água de coco de fruto verde de 6 meses. A cada 2 partes de água de coco foi adicionada 1 parte de água destilada e 1 parte de solução de citrato de sódio a 5% (NUNES, 1995). Para a preparação de 100 mL de ACP-106[®] utilizaram-se 12g de ACP-106[®], 50 mL de água destilada e 50 mL de solução de citrato de sódio a 1% (SALGUEIRO et al., 2002). Ambos os diluidores foram preparados para cada inseminação e mantidos refrigerados entre 2 e 8°C por no máximo 12h e utilizados à temperatura ambiente (aproximadamente 28 a 30°C). Apresentaram pH entre 6,4 a 6,7 e osmolaridade de 280 a 308 mOsm/L.

4. Inseminação artificial

As cadelas foram observadas semanalmente para a verificação da presença de secreção vaginal sero-sanguinolenta e edema vulvar como indicativo do começo do proestro. Os esfregaços vaginais foram realizados a cada dois dias desde o 3º dia do proestro até o dia da segunda IA ou MN, sendo corados com panótico rápido e analisado em microscopia óptica no aumento de 100x.

A primeira IA foi determinada com base no perfil celular, sendo observado um mínimo de 70% de células superficiais queratinizadas. A segunda IA, foi realizada aproximadamente 48 horas após a primeira. Antes de cada IA, a fêmea era levada a uma área de passeio a fim de estimular o reflexo de micção. O sêmen foi depositado (sêmen + DBAC ou ACP-106[®] = 8 mL, segundo DAVOL, 2001) na porção mais cranial da vagina com auxílio da sonda de Osiris[®] (IMV), estando balão de látex insuflado com ar, variando esta quantidade com a resistência da vagina (10 a 20 mL). As fêmeas foram mantidas com

os trens posteriores elevados por 10 minutos (UCHOA et al., 2002ab). Estas medidas (estímulo micção da cadela, insuflação com ar e elevação do trem posterior) foram realizadas a fim de diminuir o refluxo seminal (**FIGURA 5**).

Entre 25 e 35 dias após a segunda MN ou IA, procedeu-se à palpação para diagnóstico de gestação (**FIGURA 6**). Ao nascimento, foi observada a taxa de parição, índice de prolificidade e a proporção sexual de filhotes nascidos.

5. Análise Estatística

Os resultados das avaliações microscópicas dos parâmetros seminais observadas foram expressos em média e desvio padrão. Os resultados das taxas de parição, prolificidade e proporção macho/fêmea dos filhotes nascidos foram expressos na forma de média e erro padrão. A taxa de parição e proporção macho/fêmea dos filhotes nascidos foram analisados pelo teste do Qui-Quadrado e a prolificidade, pelo teste t de Student ($p < 0,05$). A fim de comparar a proporção macho/fêmea dos filhotes nascidos por IA ou MN para o mesmo grupo e em cada raça, foi utilizada ANOVA seguida teste de Tuckey. Para estas análises utilizou-se o programa estatístico Systat versão 7.0 USA.

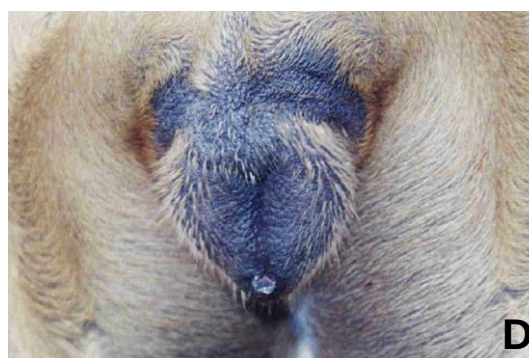
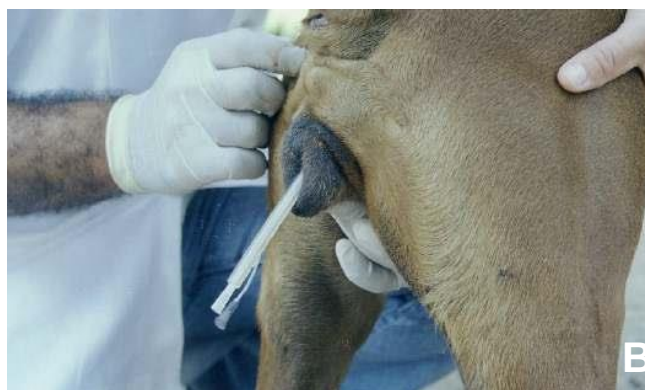
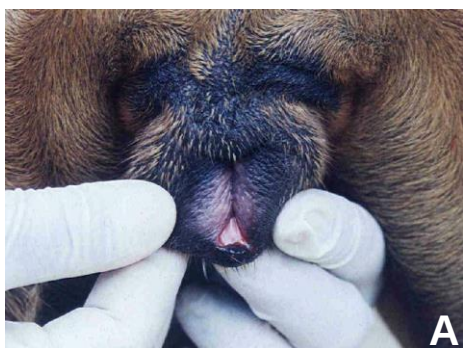


FIGURA 5: Inseminação artificial. A: abertura da vulva. B: Introdução da sonda de Osíris. C: Elevação do trem posterior da cadela e influxo seminal. D: Refluxo seminal.



FIGURA 6: Cadela do grupo 1 aos 50 dias de gestação após inseminação artificial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen dos cães utilizado para este trabalho apresentou motilidade média de $92\% \pm 8,96$ e vigor médio de $4,87 \pm 0,45$. Estes valores foram qualificados como excelentes, haja vista que são bem superiores ao mínimo de 30% de espermatozóides móveis, segundo CONCANNON & BATTISTA (1989).

As Tabelas 1, 2, 3 e 4 trazem a idade das fêmeas, dia da primeira IA ou MN em relação ao início da secreção vaginal ou primeiro dia do estro e índice de queratinização do epitélio vaginal encontradas por raça. As cadelas possuíam $29,87 \pm 1,70$ meses, com relação ao dia do início da secreção vaginal. A primeira IA ou MN foi realizada aos $11,16 \pm 0,44$ dia do início da secreção vaginal. O índice de queratinização celular atingido pelas cadelas no momento da primeira IA ou MN foi de $84,77 \pm 2,00$. Os valores, com relação ao dia médio utilizado para realização da primeira IA, foram semelhantes aos obtidos UCHOA et al., (2001) que trabalhando com cães da raça Bassethound realizou-as aos $11,5 \pm 1,1$ dia e obtiveram um índice médio de queratinização epitelial de $77,7 \pm 10,1\%$, sendo estes resultados semelhantes aos nossos mesmo trabalhando com raças diferentes.

TABELA 1: Média e erro padrão da idade em meses das fêmeas utilizadas para inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106® - Grupo 2) e seus respectivos controles por MN na raça American PitBull Terrier de acordo com as variáveis de idade (meses), intervalo (dias) do 1º dia de secreção serosanguinolenta ao 1º dia da MN ou IA ([] proestro-estro) e taxa de queratinização (%).

	GRUPO 1 (n=13)		GRUPO 2 (n=13)	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Idade				
(meses)				
[] Proestro-Estro	$10,38 \pm 0,50$	$10,31 \pm 0,51$	$10,23 \pm 0,80$	$10,31 \pm 0,80$
(dias)				
Taxa de				
Queratinização	$80,00 \pm 2,77$	$81,54 \pm 3,17$	$81,54 \pm 2,49$	$82,31 \pm 1,93$
(%)				

TABELA 2: Média e erro padrão da idade em meses das fêmeas utilizadas para inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106® - Grupo 2) e seus respectivos controles por MN na raça Boxer de acordo com as variáveis de idade (meses), intervalo (dias) do 1º dia de secreção serosanguinolenta ao 1º dia da MN ou IA ([] proestro-estro) e taxa de queratinização (%).

	GRUPO 1 (n= 16)		GRUPO 2 (n= 16)	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Idade (meses)	29,37 ± 2,43	35,69 ± 2,34	29,25 ± 3,62	35,25 ± 3,62
[] Proestro-Estro (dias)	10,06 ± 0,40	10,06 ± 0,42	10,94 ± 0,54	11,19 ± 0,56
Taxa de Queratinização (%)	78,12 ± 2,08	80,62 ± 2,32	86,87 ± 2,73	83,44 ± 2,95

TABELA 3: Média e erro padrão da idade em meses das fêmeas utilizadas para inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106® - Grupo 2) e seus respectivos controles por MN na raça Labrador de acordo com as variáveis de idade (meses), intervalo (dias) do 1º dia de secreção serosanguinolenta ao 1º dia da MN ou IA ([] proestro-estro) e taxa de queratinização (%).

	GRUPO 1 (n=11)		GRUPO 2 (n=10)	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Idade (meses)	37,54 ± 3,88	42,64 ± 4,20	30,70 ± 3,74	37,00 ± 3,70
[] Proestro-Estro (dias)	10,27 ± 0,43	10,06 ± 0,42	10,30 ± 0,50	10,30 ± 0,56
Taxa de Queratinização (%)	77,27 ± 2,37	80,62 ± 2,32	88,000 ± 2,91	84,00 ± 3,05

TABELA 4: Média e erro padrão da idade em meses das fêmeas utilizadas para inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106® - Grupo 2) e seus respectivos controles por MN na raça Rottweiler de acordo com as variáveis de idade (meses), intervalo (dias) do 1º dia de secreção serosanguinolenta ao 1º dia da MN ou IA ([] proestro-estro) e taxa de queratinização.

	GRUPO 1 (n= 28)		GRUPO 2 (n= 28)	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Idade (meses)	23,46 ± 1,40	29,96 ± 1,36	29,96 ± 2,02	36,11 ± 2,02
[] Proestro-Estro (dias)	11,07 ± 0,39	11,11 ± 0,44	11,11 ± 0,43	11,36 ± 0,50
Taxa de Queratinização (%)	85,36 ± 2,02	83,93 ± 2,20	82,50 ± 1,90	82,32 ± 1,95

Com relação à prolificidade (**TABELA 5**), embora esta deva ser analisada por raça, a prolificidade média foi considerada dentro do padrão para cães de médio porte, segundo SORRIBAS (1995).

TABELA 5: Índice de prolificidade (total e por sexo) após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106®- Grupo 2) e seus respectivos controles por monta natural (MN).

	GRUPO 1 (n= 68)		GRUPO 2 (n= 67)	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Macho	3,79 ± 0,21 ^{Aa}	2,76 ± 0,17 ^{Aa}	3,78 ± 0,20 ^{Aa}	2,75 ± 0,18 ^{Aa}
Fêmea	3,73 ± 0,21 ^{Aa}	5,44 ± 0,28 ^{Ba*}	3,37 ± 0,19 ^{Aa}	4,95 ± 0,29 ^{Ba}
Total	7,53 ± 0,40	8,21 ± 0,38	7,16 ± 0,35	7,12 ± 0,43

a, b- letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos.

A,B- letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística.

* - Índica diferenças na mesma linha dentro do mesmo grupo.
p< 0,05.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as taxas de parição e prolificidade dentro do mesmo grupo ou entre grupos como expressos na **Tabela 6**. Segundo DAURIO et al. (1987), trabalhando-se com casais de cães sadios submetidos à MN, pode-se obter em media 85% de taxa de parição. Resultados semelhantes foram encontrados por PEREIRA et al. (2001), UCHOA et al. (2000, 2001 e 2002bc), que obtiveram 100%, 85,7%, 100% e 88,9%, de taxa de parição respectivamente. Com relação aos valores encontrados para IA utilizando DBAC, os resultados foram semelhantes aos encontrados por PEREIRA et al. (2001) e UCHOA et al. (2002bc) que obtiveram 100%, 88,9%. Neste último trabalho citado, foram utilizadas 18 cadelas, onde 9 foram submetidas à MN e 9 à IA com DBAC. No presente trabalho, foram utilizados 68 animais para IA com DBAC, onde o mesmo animal era submetido à MN e posteriormente à IA, o que garante uma maior confiabilidade dos dados.

TABELA 6: Taxa de parição e índice de prolificidade após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106®- Grupo 2) e seus respectivos controles por monta natural (MN).

	GRUPO 1 (n= 68)		GRUPO 2 (n= 67)	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Taxa de Parição	94% (64/68)	97% (66/68)	91% (61/67)	91% (61/67)
Índice de Prolificidade	7,53 ± 0,40	8,21± 0,38	7,16 ± 0,35	7,12 ± 0,43

p > 0,05.

Com relação à proporção macho/fêmea, foi observada diferença significativa a favor dos diluidores à base de água de coco em relação à monta natural com uma predominância no nascimento de fêmeas, quando da utilização de IA com DBAC e ACP-106®, não havendo diferença estatística entre os diluidores testados. Foram obtidos um total de 1070 filhotes nascidos no Grupo 1 e 996 no Grupo 2, totalizando 2066 filhotes nascidos neste experimento. (**Tabela 7**). Quando esta proporção foi analisada entre IA e MN para o DBAC e ACP-106® dentro de uma mesma raça, somente a raça Labrador não apresentou diferença significativa entre o nascimento de machos e fêmeas para o diluidor ACP-106® (**Tabelas 8, 9, 10 e 11**).

De acordo com NUNES (1986), a fertilidade de cabras inseminadas com sêmen diluído em água de coco é superior a de cabras inseminadas com sêmen diluído em leite desnatado, com uma proporção de 72% de fêmeas e 28% de machos para 266 cabritos nascidos. NUNES (1987) confirmou o nascimento de um maior número de crias do sexo feminino novamente utilizando sêmen diluído em água de coco. Já SALLES (1989),

inseminando cabras com diluidores a base de água de coco (*in natura*, gel e DBAC) obteve em 65 cabras paridas com uma proporção de 73,84% de crias do sexo feminino. Isto pode ser atribuído, segundo SALLES (1989) e NUNES (1987) ao possível favorecimento de espermatozóides “X”, por fatores físico-químicos que ainda não são completamente conhecidos. Observações deste tipo ainda não são conhecidas em outras espécies.

TABELA 7: Proporção sexual dos filhotes (machos e fêmeas) nascidos após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106®- Grupo 2) e seus respectivos controles por monta natural (MN).

	GRUPO 1		GRUPO 2	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Machos	50,40% ^{Aac} (258)	33,70% ^{Aad*} (188)	52,71% ^{Aac} (253)	35,66% ^{Aad*} (184)
Fêmeas	49,60% ^{Aac} (254)	66,30% ^{Bad*} (370)	47,29% ^{Aac*} (227)	64,34% ^{Bad*} (332)
Sub-Total	512	558	480	516
Total	1070		996	

a, b- letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos.

A,B- letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística.

c, d - letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística dentro dos grupos.

* - Índica diferenças na mesma linha dentro do mesmo grupo.

p< 0,05.

TABELA 8: Média e erro padrão do índice de prolificidade de cada sexo nascidos após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- Grupo 1) ou água de coco em pó (ACP-106®- Grupo 2) e seus respectivos controles por MN na raça American PitBull Terrier (MN).

	GRUPO 1 (n = 13)		GRUPO 2 (n = 13)	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Macho	4,08 ± 0,42 ^{Aa}	2,92 ± 0,37 ^{Aa}	4,00 ± 0,38 ^{Aa}	3,77 ± 0,38 ^{Aa}
Fêmea	4,00 ± 0,39 ^{Aa}	6,31 ± 0,54 ^{Ba*}	3,92 ± 0,43 ^{Aa}	5,46 ± 0,6 ^{Ba*}
Total	8,077 ± 0,755	9,231 ± 0,709	7,923 ± 0,772	9,231 ± 0,885

a, b- letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos.

A,B- letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística.

* - Índica diferenças na mesma linha dentro do mesmo grupo.
p< 0,05.

TABELA 9: Média e erro padrão do índice de prolificidade de cada sexo nascidos após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC-GRUPO 1) ou água de coco em pó (ACP-106®- GRUPO 2) e seus respectivos controles por monta natural na raça Boxer (MN).

	GRUPO 1 (n = 16).		GRUPO 2 (n=16)	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Macho	3,06 ± 0,45 ^{Aa}	2,63 ± 1,8 ^{Aa}	3,19 ± 0,30 ^{Aa}	2,13 ± 0,30 ^{Aa}
Fêmea	2,94 ± 0,40 ^{Aa}	5,00 ± 0,34 ^{Ba*}	2,87 ± 0,27 ^{Aa}	4,13 ± 0,50 ^{Ba*}
Total	6,00 ± 0,791	7,625 ± 0,446	6,063 ± 0,504	6,250 ± 0,739

a, b- letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos.

A,B- letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística.

* - Índica diferenças na mesma linha dentro do mesmo grupo.
p< 0,05.

TABELA 10: Média e erro padrão do índice de prolificidade de cada sexo nascidos após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- GRUPO 1) ou água de coco em pó (ACP-106®-GRUPO 2) e seus respectivos controles por monta natural na raça Labrador (MN).

	GRUPO 1 (n=11)		GRUPO 2 (n=10)	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Macho	3,09 ± 0,49 ^{Aa}	2,09 ± 0,39 ^{Aa}	3,00 ± 0,37 ^{Aa}	1,70 ± 0,45 ^{Aa}
Fêmea	3,55 ± 0,56 ^{Aa}	4,91 ± 0,61 ^{Ba*}	3,00 ± 0,47 ^{Aa}	3,20 ± 0,65 ^{Aa}
Total	6,636 ± 1,038	7,00 ± 0,831	6,00 ± 0,745	4,90 ± 1,048

a, b- letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos.

A,B- letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística.

* - Índica diferenças na mesma linha dentro do mesmo grupo.
p < 0,05.

TABELA 11: Média e erro padrão do índice de prolificidade de cada sexo nascidos após inseminação artificial com diluidor à base de água de coco (DBAC- GRUPO 1) ou água de coco em pó (ACP-106®- GRUPO 2) e seus respectivos controles por monta natural na raça Rottweiler (MN).

	GRUPO 1 (n=28)		GRUPO 2 (n=28)	
	MN	IA (DBAC)	MN	IA (ACP-106®)
Macho	4,36 ± 0,32 ^{Aa}	3,04 ± 0,33 ^{Aa}	4,29 ± 0,36 ^{Aa}	3,00 ± 0,26 ^{Aa}
Fêmea	4,14 ± 0,35 ^{Aa}	5,50 ± 0,54 ^{Ba*}	3,54 ± 0,32 ^{Aa}	5,86 ± 0,45 ^{Ba*}
Total	8,500 ± 0,607	8,536 ± 0,737	7,857 ± 0,617	8,857 ± 0,608

a, b- letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos.

A,B- letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística.

* - Índica diferenças na mesma linha dentro do mesmo grupo.
p< 0,05.

O Kennel Club do Estado do Ceará no ano de 2000 registrou 658 filhotes das mesmas raças utilizadas neste trabalho sendo 310 fêmeas (46,69%) e 354 (53,31%) não havendo diferença com relação ao número de machos ou fêmeas. Esses filhotes foram todos oriundos de monta natural (**Tabela 12**). Contudo, quando este parâmetro é analisado por raça, somente a raça Boxer apresenta diferença significativa entre o nascimento de machos e fêmeas. Deve-se considerar que o número de filhotes registrados nos Kennels Clubs são inferiores ao número real de animais nascidos por ninhada, já que não são registrados animais que vem a óbito ou animais que fogem ao padrão racial.

Tabela 12: Número e percentual de filhotes nascidos de cada sexo nas raças American Pit Bull Terrier, Boxer, Labrador e Rottweiler registrados no Kennel Club do Estado do Ceará no ano 2000.

	Machos	Fêmeas	Total
American Pit Bull Terrier	66 (54,54%) ^a	55 (45,46%) ^a	121
Boxer	52 (59,77%) ^a	35 (40,23%) ^b	87
Labrador	36 (52,17%) ^a	33 (47,83%) ^a	69
Rottweiler	200 (51,68%) ^a	187 (48,32%) ^a	387
Total	354 (53,31%)	310 (46,69%)	664

a,b- letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Com relação a IA com ACP-106[®], embora esta forma de utilização da água de coco já tenha sido testada *in vitro* para cães CARDOSO et al (2003 e 2004) e SILVA et al (2004a), e *in vivo* para caprinos (SALGUEIRO et al., 2002) e ovinos (SALGUEIRO et al., 2004), trata-se do primeiro trabalho com o uso deste diluidor em IA na espécie canina.

Os bons resultados obtidos com DBAC na IA deve-se provavelmente às características da solução que é naturalmente estéril e contém sais, açúcares e fitohormônios, como o ácido 3 indol-acético, que são elementos benéficos para a sobrevivência espermática (NUNES & SALLES, 1993; RODRIGUES *et al.*, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1994). Esta última substância testada *in vitro* conferiu um incremento no vigor e na motilidade dos espermatozóides caprinos (NUNES & COMBARNOUS, 1995) e caninos (UCHOA *et al.*, 2002a). Além disto, a manutenção de boas condições clínico-sanitárias de todos os animais envolvidos é essencial para a obtenção de elevadas taxas de parição e prolificidade, assim como foram observadas no presente trabalho.

O uso de IA com DBAC ou ACP-106[®] constitui-se uma boa alternativa nos casos de necessidade de fracionamento seminal, na impossibilidade de acasalamento por acentuada desproporção sexual ou agressividade inerente a determinadas raças (Bull Terrier, Staffordshire Bull Terrier e American Pit Bull Terrier), na prevenção de doenças sexualmente transmissíveis (SILVA *et al.*, 2003) e nas raças que dependem da intervenção humana para o acasalamento (Bulldog Inglês em 100% dos casos – UCHOA, 2004 – dados não publicados).

CONCLUSÕES

1. O DBAC e o ACP-106[®] são excelentes alternativas para IA em cadelas com sêmen a fresco, pois apresentam 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.

2. A obtenção de taxas de parição e índice de prolificidade semelhantes, bem como uma proporção sexual favorável ao sexo feminino similar para ambos diluidores (DBAC e o ACP-106[®]), mostra que o processo de pulverização a seco (Spray Dryer) não altera as propriedades da água de coco.

PERSPECTIVAS

1. O DBAC e o ACP-106[®] necessitam ser testados na IA de cadelas com sêmen resfriado e congelado/descongelado, a fim de avaliar as taxas de parição e prolificidade e proporção sexual dos filhotes nascidos.

2. A possibilidade de testar o DBAC e o ACP-106[®] na IA em rebanhos de ruminantes (bovinos, caprinos e ovinos) de produção leiteira que necessitam do nascimento de uma maior quantidade de fêmeas em relação a machos.

3. Estudar fatores e interações moleculares que propiciam o nascimento de um maior número de fêmeas para que desta forma possa ser estabelecido segundo o interesse dos criadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R. P., HAMMERSTEDT, R. H. In vitro evaluation os sperm quality: an opnion. *Journal of Andrology*, v. 14, p. 397-406, 1993.
- BADINAND, F., FONTBONNE, A., ADOUE, C. Préparation, conditionnement, conservation et utilisation de la semence du chien en insémination artificielle. *Elevage et Insémination*, v. 239, p. 3-15. 1990.
- BETINI, C. M., MORAES, G. V., RIGOLON, L. P. Inseminação artificial de cadelas com sêmen fresco diluído em meios formulados com água de coco e leite em pó desnatado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, n.3, p. 373-375, 2001.
- BRAZ V. B, ARAUJO A. A., NUNES J. F., et al.Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. *Rev. Bras. de Reprod. Anim.*, v. 27, n. 3, p. 328-329, 2003.
- CARDOSO, R. C. S., SILVA, A. R., UCHOA, D. C., et al. Efeito da água de coco, gema de ovo e glicerol sobre a qualidade do sêmen canino congelado. In: ANAIS DA III SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UECE, 1998, p.284.
- CARDOSO, R. C. S. *Congelação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco*. Fortaleza, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará- UECE, 2001).
- CARDOSO, R. C. S., SILVA, A. R., UCHOA, D. C., et al. Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco. *Ciência Rural*, v.35, n.2., 2002.
- CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., SILVA LDM. Efeito do método de diluição sobre a qualidade do sêmen canino congelado com diluidor a base de água de coco. In: ANAIS DA VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 2003, p. 1.
- CARDOSO R. C. S., SILVA, A. R., SILVA L. D. M. Use of the alternative extender powder coconut water (PCW 106®) for canine semen freezing. In: 5TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION- Proceedings, 2004, p. 96-97.
- CHRISTIANSEN, I. J. *Reprodução no cão e no gato*. Editora Manole, p. 363, 1988.
- CONCANNON, P. W., BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. (ed) *Current Veterinary Therapy*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989.

COTORELLO, A. C. P., HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação, e avaliação do sêmen equino (Revisão de Literatura). *Rev. Bras. de Reprod. Anim.*, v. 26, n. 1, p. 14-25, 2002.

DAURIO CP, GILMAN MR., PULLIAM JD., SEWARD RL. Evaluation of male Beagles and safety of ivermectin. *American Journal of Veterinary Research*, 1987; 48, 1755-1760.

DAVOL, P. A Canine Reproduction: Reproduction and the male dog. Wing-N-Wave Labradors, 2001.
Disponível em: < <http://www.labbies.com/reproductuion4.htm> > - Acesso 20 jun. 2002.

ENGLAND, G. C. W., ALLEN, W. E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II: Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, v. 37, p. 373-381, 1992.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 785, 1996.

FONTBONNE, A. L'insemination artificielle dans l'espece canine. In: Reproduction Canine Anais (Association pour l'etude de la reproduction animale), Paris. Anais...Paris, 1993, p. 6.

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. Anim.*, v. 12, p. 153-156, 2002.

JOHNSTON, S. D., KUSTRITZ, M. V. R., OLSON, P. N. S. *Canine and feline theriogenology*. Filadelfia. Ed. W.B Saunders Company, p. 592, 2001.

LAGUNA, L. E. *Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades "Cocus nucifera" coco da praia e anão*. Fortaleza, 1996. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1996).

LETHAM, D. S. Regulators of cell division in plant tissue: the cytokines of coconut milk. *Physiol. Plant*, v. 32, p. 66-70, 1974.

LIDSAY, F. E. F. C. The normal endoscopy appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post uterine endoscopy, *Journal of Small Animal Practice*, v. 24, p. 1-115, 1983.

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

MIALOT, J. P., DUMON, C., CASSOU, B. Insémination artificielle chez la chienne: Mise en place de semence fraîche avec le pistolet souple "osiris". *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, v.20, n. 3, p. 213-220, 1985.

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. Anais...Olinda, p. 534, 1994.

NUNES, J. F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: SIMPÓSIO DA CAPRINOCULTURA DO ESTADO DO RIO, 1986, Niterói. Anais...Niterói, 1986.

NUNES, J. F. Coconut water as diluent for goat semen. In: IV CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS, 1987, Brasília. Anais...Brasília, 1987.

NUNES, J. F., SALLES, F. G. M. El agua de coco (*Cocos nucifera* L.) "in natura", integral y adicionada com citoquininas, como dilutor de semen caprino. *Rev. Cient.* v. 3, p.273-281, 1993.

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

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: I SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza. Anais...Fortaleza, 1995, p.53-63.

NUNES, J. F., SALGUEIRO, C. C. M. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. *Rev. Cient. Prod. Animal*, v. 1, p.17-26, 1999.

OLIVEIRA, L. F., EVANGELISTA, J. J. F., BEZERRA, M. B., NUNES, J. F. Água de coco *in natura* adicionada ou não de gema de ovo e sob a forma estabilizada de gel como diluidor do sêmen ovino. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Olinda, Anais...Olinda, 1994, p. 561.

PEREIRA, B. S., UCHOA, D. C., AQUINO, C.A., et al. O efeito do uso de diluentes à base de água de coco no resfriamento do sêmen canino a 4°C. In: I SIMPÓSIO CEARENSE DE CIÊNCIA ANIMAL, Fortaleza, Anais...Fortaleza, v.1 , p.94, 1999.

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*, v. 11, n. 2, , p. 97-100, 2001.

RODRIGUES, A. P. R., TORRES, M. Z. G., OLIVEIRA, L. F., et al. Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como

diluidores do sêmen caprino. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1994, Olinda. *Anais...Olinda*, 1994, p.540.

RODRIGUES, B. A., RODRIGUES, J. L. Endocrinologia reprodutiva na cadela. *Clinica Veterinária*, v. 40, p. 50-58, 2002.

SALGUEIRO, C. C. M., NUNES, J. F., OLIVEIRA, K. L. P., et al. Utilização de diluentes à 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.

SALGUEIRO, C. C. M., GONDIM, J. M., NUNES, J.F., CORDEIRO, M. A., CAVALCANTE, J. M. M., MACHADO, V. P., PINHEIRO, J. H. T. Artificial insemination of ewes with sêmen diluted powder coconut water (ACP-102®), cooled and stored at 4 °C. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 2004, Porto Seguro. *Proceedings...Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, 2004, p. 374.

SALLES, M. G. F. Água de coco (*Cocus nucifera* L.) *in natura*, sob a forma de gel e estabilizada como diluidor do sêmen caprino. Porto Alegre, 1989. Dissertação (Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1989).

SALLES, M. G. F., NUNES, J. F. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino diluído em água de coco *in natura* adicionada da fração ativa JYP. *Ciência Animal*, v. 2, p. 115-125, 1992.

SAMPAIO-NETO, J. C., SALGUEIRO, C. C. M., MATEOS-REX, E. , NUNES, J. F. Utilization of ACP-105® extender in the refrigeration of stallion semen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.5, p. 137-139, 2002.

SEAGER, S. W. J., PLATZ, C. C. Artificial insemination and frozen semen in the dog, *Veterinary Clinics of North America*, v.7, p.757-764, 1977.

SEAGER, S. W. J. Artificial insemination in dogs. In: T.J. Burke. *Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment*. Philadelphia, Ed. Lea & Febiger, p. 207 – 217, 1986.

SILVA A. R., CARDOSO R. C. S. , SILVA L. D. M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 98, n. 546, p. 53- 60, 2003.

SILVA A. R., CARDOSO R. C. S. , SILVA L. D. M. Comparison between powder coconut water (PCW 106®) and Tris buffer as extenders for canine semen cryopreservation. In: 5TH

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, Proceedings, 2004a; p.98-99.

SILVA, A. R., CARDOSO, R. C. S., SILVA, L. D. M. Congelação 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, p. 1021-1025, 2000.

SILVA, A. R., SATZINGER, S., LEITE, L. G., SILVA, L. D. M. Gestação obitida por inseminação artificial com sêmen canino refrigerado transportado   distância – relato de caso. *Clinica Veterinária*, , n.50, p.56-64, 2004b

SILVA, A. R., UCHOA, D. C., SILVA, L. D. M. Inseminação artificial intravaginal em cães utilizando-se a Sonda de Osiris[ ]. *Ciência Animal*, v. 10, n. 3, p. 264, 2001.

SILVA, L. D. M. Tecnologia do sêmen canino. In: I SIMPÓSIO CEARENSE DE CIÊNCIA ANIMAL, 1999, Fortaleza. Anais... Fortaleza, p. 43-49, 1999.

SILVA, L. D. M., ONCLIN, K., LEJEUNE, B., et al. *Veterinary Record*, v.138, 154-157, 1996.

SILVA, L. D. M., ONCLIN, K., SNAPS, F., et al. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology*, v.43, p.615-623, 1995.

SILVA, L. D. M., SILVA, A. R., CARDOSO, R. C. S. Inseminação artificial em cães. In: GONSALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R.F., FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas Aplicadas   Reprodução Animal*. São Paulo, Ed. Varela, p.69-95, 2002.

SILVA, L. D. M., VERSTEGEN, J. P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v.44, p.571-579, 1995.

SIMPSON, G., ENGLAND., G., HARVEY, M. *Manual of small animal reproduction and neonatology*. London, British Small Animal Veterinary Association, p. 235, 1998.

SORRIBAS, C. E. *Reproduccion en los animales pequeños*. Buenos Aires, Ed. Interm dica, p. 152, 1995.

STR M HOLST, B. *In vitro characterization of cryopreserved canine spermatozoa*. Swede, 1999. Tese (Swedish University of Agricultural Sciences-1999).

TARDIFF, S., LAFOREST, J. P., CORMIER, N., et al. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, v.52, p. 447-459, 1999.

TEIXEIRA, M. D. A., RODRIGUES, A. P. R., SOUSA, N. M., et al. Avaliação da taxa de degradação da motilidade do s men de ovinos deslanados e caprinos, diluídos em água de coco e suas frações. In: ANAIS DO XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA

VETERINÁRIA, 1994, p. 589.

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.

TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fert.* v.39, p. 269- 275. 1989.

UCHOA D. C., SILVA A. R., SILVA L. D. M. Eficiência da monta natural e da inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas nulíparas da raça Boxer. *Ciência Animal*, v. 10, n. 1, p.159-160, 2000.

UCHOA, D. C. Comparação de diferentes diluidores de sêmen na inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer. *Ciência Animal*, v. 12, n. 1, p. 131-134, 2002b.

UCHOA, D. C., CARDOSO, R. C. S., SILVA, L. D. M Inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer com diferentes diluidores de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* Supl. n.5, p. 150-152 , 2002c.

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

UCHOA, D. C., SILVA, A. R., CARDOSO, R. C. S., et al. Conservação do sêmen canino a 37 °C em um diluidor à base de água de coco ou liquido prostático autólogo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n. 3p..324-325, 2003.

UCHOA, D. C., SILVA, A. R., SILVA, T. F. P., et al. Inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Bassethound utilizando a Sonda de Osiris®. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, n. 3, p.371-373, 2001.

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. *Oxford Reviews Reproduction and Biology.* v.1, p.183-350, 1979.

WILDT, D., PUKAZHENTHI, B., BROWN, J., et al. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 7, p. 811-824, 1995.

ANEXOS

Artigo enviado ao Periódico Theriogenology

Artificial insemination in bitches using fresh semen diluted in coconut water extenders

Daniel C. Uchoa^{1*}; Ticiana F. P. Silva¹; Airton A. Araújo¹; Lúcia D. M. Silva¹.

¹ Post Graduation Program in Veterinary Sciences – State University of Ceará

*Laboratory of Carnivore Reproduction - Veterinary School-FAVET/ State University of

Ceará- UECE, Paranjana Ave. 1700, Itaperi, Fortaleza-Ceará, 60715-100, Brazil,

Tel.: +55 85 32992754, Fax: +55 85 32992740

e-mail: danielcoutouchoa@aol.com

Running title: Artificial insemination in bitches with coconut water

Abstract

Artificial insemination is an important tool when of the impossibility of the mating among couples of healthy dogs. However for the insemination with fresh semen is necessary to have a minimum volume to inseminate. The extenders based on coconut water appear as an important alternative for artificial insemination with fresh semen. This work aimed to test the extenders based on coconut water in the artificial insemination in dogs, comparing the parturition rate, prolificity and sexual proportion of the litter. For so much, Rottweiler, American Pit Bull Terrier, Boxer and Labrador bitches were used and divided in two groups. Group 1 (68 bitches) was inseminated with coconut water extender and group 2 (67 bitches) with extender based on coconut water under powdered form. Bitches obtained a parturition rate of 97% and 91%, respectively for groups 1 and 2, prolificity of 8.21 ± 0.38 (group 1) and 7.12 ± 0.43 (group 2), with no significant difference for these parameters. On the other hand, the sexual proportion was of 66.30% of females in the group 1 and 64.34% in group 2. These values showed superiority in the number of females when compared to the males. From these data, we can conclude that the extenders based on coconut water are an excellent alternative for artificial insemination in dogs with fresh semen, because they present a parturition rate and prolificity similar to natural breeding. Moreover, these extenders favorate the birth of a larger number of females in relation to males per litter.

Keywords: Artificial insemination, bitches, coconut water extenders, fresh semen, dog

1. Introduction

In 1780, Spallanzani was the first to report an artificial insemination (AI) conducted in canine species [1]. AI is a biotechnique extensively used in assisted reproduction of various species [2]. Among dog breeders, there is an increasing interest in the improvement of the reproductive efficiency of their animals and AI seems to be an important tool for this proposal.

Nowadays, AI has become a usual tool for veterinarians who work with genetic improvement in dogs [3-7]. However, during semen collection, there is a possibility of inhibition of the dog that could not provide a minimum inseminating volume. In this case, it is necessary to add an extender for the AI [8]. For this reason, a large number of semen extenders have been tested *in vitro* and *in vivo* to expand the seminal volume such as: autologous prostatic fluid [4,7], physiologic salt solution [6], skimmed [9], tris [4,10], and other commercial extenders.

As an alternative for conventional extenders, *in natura* coconut water (NCW) solution was successfully used *in vivo* as a semen extender in guinea hens [11], caprines [12], ovines [13] and swines [14]. In dogs, NCW showed excellent results for semen freezing [15-17], cooling [18,19] and for conservation of fresh semen at 37°C for up to 180 min [5]. Furthermore, NCW was tested *in vivo* for AI in different dog breeds (DBAC) [5,6, 20,21,22]. In addition, experiments in caprines suggest that NCW provides the birth of a higher number of female than male animals [13, 23].

Some practical difficulties appear as obstacles for the use of NCW as a semen extender, such as the necessity of using six-month old fruits and the impossibility for its storage without losing its biochemical characteristics. For this reason, SALGUEIRO et al.

[24] developed the standardized powdered coconut water (PCW), which is obtained by vaporization in “*Spray Dryer*”. PCW allows the conservation of the coconut water characteristics and facilitates its use in regions where the fruit does not exist. Aiming to prove the efficiency of PCW for the canine species, it was tested *in vitro* as an extender for canine semen freezing [25-27]. *In vitro* tests were also conducted for caprine [24], ovine [28] and equine [29] semen. However, *in vivo* tests were only conducted in the caprine species [24].

NCW and PCW could represent excellent alternatives for an extensive use of AI in order to perform genetic improvement in the canine species. Moreover, this dilution method could be also used in endangered canine species that need to improve the fertility and the number of born animals. This way, the aim of this study was to test NCW and PCW in intravaginal AI using fresh canine semen, evaluating parturition rates, number of born puppies (prolificity rate) and sexual proportion among them.

2. Material and Methods

2. 1. Animals

Private kennels provided the dogs used in these experiment kennels, which were 135 bitches (25 to 40 Kg) and 16 proven stud dogs (25 to 60 Kg) from different breeds such as the American Pit Bull Terrier, Labrador Retriever, Boxer and Rottweiler. The animals were kept in individual boxes, fed dry food twice a day with free access to water. A clinical evaluation was conducted in animals once a month, during two months before the beginning of the experiment. The dogs were treated against worm infections and vaccinated against rabies and other infectious-contagious diseases. When the dogs presented some

clinical signs of blood dynamic disorders, such as erlichiosis or babesiosis, the suspect animals were submitted to a complete blood exam for diagnosis and treatment before natural mating (NM) or AI. Animals that did not respond to the treatment were discarded from the experiment.

Stud dogs were previously submitted to a selection based on its seminal quality. To participate in the experiment, dogs had to show a sperm motility $\geq 70\%$, vigor ≥ 4 and morphologic abnormalities $\leq 15\%$ [4]. Regarding the females, only puberty bitches were selected. These females were divided in two groups: first group (n = 68) was submitted to AI using NCW; the second one (n = 67) was submitted to AI using PCW. All the bitches were previously submitted to NM in a former estrous cycle, using the same male used for AI.

2.2. Semen collection

Ejaculates were collected by digital manipulation, using a funnel coupled to graduated tubes [30]. The semen was separated into its three fractions and the sperm rich fraction was retained for gross evaluations such as color, aspect, viscosity and volume, and microscopic evaluations such as sperm motility (percentage of motile spermatozoa) and vigor (status of the motility on a scale from 0 to 5). After analysis, sperm rich fractions were used for AI.

2.3. Extenders

NCW extender was prepared by filtering the coconut water from a six-month old fruit in a filter paper. The extender consisted of 50% coconut water, 25% distilled water and 25% anhydrous monosodium citrate solution at 5% [31]. To prepare 100 mL PCW extender, 12g PCW obtained by Spray Dryer was used, dissolved in 50 mL distilled water plus 50 mL anhydrous monosodium citrate solution at 1% [24]. Both extenders were prepared for each AI and kept under refrigeration at 2 to 8°C for up to 12h. Extenders were used at environmental temperature (28 to 30°C) and presented a pH between 6.4 - 6.7 and osmotic pressure 280 – 308 mOsm/L.

2. 4. Artificial inseminations

Each week, the bitches were observed concerning the presence of vaginal discharge and vulvar swelling, which indicates the proestrous. After the third day from the beginning of the proestrous, vaginal smears were prepared every day until the day of the second NM or AI. These vaginal smears were stained with diff quick and were analyzed under light microscopy (100x). When the vaginal cellular profile showed at least 70% superficial cells, the first AI was conducted and the second one was performed after 48h.

Before each AI, the bitches were taken to walk in order to stimulate them to urinate. Concerning AI, semen was extended in a proportion of 1mL semen to 7mL NCW or PCW. Semen was deposited in the cranial vagina by using an Osiris[®] probe (IMV), whose latex balloon was air filled (10 to 20mL), according to vaginal resistance. Females were kept with their hindquarters elevated for 10 min [5,6] in order to reduce seminal reflux.

Between 25 and 35 days after the second MN or AI, the pregnancy diagnosis was conducted by abdominal palpation. At birth, the parturition and prolificity rates and the male/female proportion among born puppies were verified.

2.5. Statistical Analysis

Data from the microscopic semen evaluation were expressed as mean and standard deviation. Data from parturition and prolificity rates were expressed as mean and standard error and were evaluated by the Chi-square and Student t test, respectively ($p < 0.05$). The male/female proportion in born puppies was expressed as mean and standard error and analyzed by the Student t test ($p < 0.05$).

3. Results

Fresh semen of the dogs was white in color with milky viscosity, showing $92.0 \pm 8.96\%$ motile spermatozoa with vigor 4.87 ± 0.45 .

No statistical differences were observed among groups regarding parturition and prolificity rates as showed in Table 1.

Regarding the male/female proportion, a significant difference was observed showing a high number of born females in the AI using NCW or PCW, when compared to MN. However, no difference between extenders was observed (Table 2). The total number of born puppies to each gender is expressed in Table 3.

4. Discussion

According to Daurio et al. [32], when working with healthy dogs submitted to NM, a parturition rate of 85% could be obtained. In the present work, a parturition rate of 94% (Group 1) and 91% (Group 2) were obtained for the NM. Parturition rates of 100%, 85.7%, 100% and 88.9% were also verified by other researchers [20, 33, 34, 7].

Regarding to the use of NCW extender, our results were similar to those previously found by Pereira et al. [20] and Uchoa et al. [7] that obtained 100% and 88,9% parturition rates using the same extender. However, UCHOA et al. [7] used only 18 bitches, of which nine were submitted to NM and nine to AI using NCW. In the present study, the data is more reliable, since 68 animals were used for AI with NCW and all the animals were previously submitted to NM. For the use of PCW, even though this extender had already been tested *in vitro* for the canine species [25-27] and *in vivo* for the caprine species [24], the present study is the first to report the use of PCW for AI in canine species.

Auspicious results obtained with coconut water extenders are due to the characteristics of this solution, which is sterile and contains salt, sugars and phytormones such as 3-indol acetic acid (IAA). Those substances act as beneficial elements promoting sperm survival [35-37]. The phytormone IAA was isolated and tested *in vitro* and it was verified to promote an increarse in sperm motility and vigor in caprine [38] and canine species [6]. Moreover, a rigorous control of the clinic-healthy conditions of all animals involved in this experiment was essential for the high parturition and prolificity rates observed in the present work.

The use of NCW or PCW seems to be an efficient alternative in the cases when seminal fractionating is needed or when there are accentuated sexual morphologic differences or aggressiveness inherent to some dog breeds such as the Bull Terrier,

Staffordshire Bull Terrier and American Pit Bull Terrier, and also in those breeds that depend on human intervention for the mating such as the English Bulldog (UCHOA, unpublished data). These coconut water extenders could also be used when AI is conducted in order to prevent transmissible sexual diseases [39].

According to NUNES [13], the fertility in goats inseminated with NCW is better than in those inseminated with skimmed milk and a proportion of 72% female and 28% male for 266 born kids could be observed. Later, the same author [40] confirmed the birth of a higher number of female kids by using NCW [40]. Moreover, in goats inseminated with coconut water extenders in jelly form or *in natura*, 73.84% female kids born in 65 parturitions [23]. According to that author, unknown physical-chemical factors present in coconut water possibly propitiate “X” spermatozoa. These observations are unknown in other species.

Even if the prolificity could be analyzed breed by breed, the mean number of born puppies (Table 2) was considered within the general standard described for medium size dogs [41]. In the present research, 1070 puppies were born in Group 1 and 996 in Group 2, a total of 2066 born puppies.

In conclusion, NCW and PCW extenders seem to be excellent alternatives for artificial insemination using fresh canine expanded semen because they provide parturition and prolificity rates similar to those provided by natural mating. Furthermore, both extenders promote the birth of a higher number of female than male puppies.

5. Acknowledges

The authors would like to thank to ÈFFEN from Brazil for dry food supply and CNPq, CAPES and FUNCAP for financial support.

6. References

- [1] Badinand F, Fontbonne A, Adoue C. Préparation, conditionnement, conservation et utilisation de la semence du chien en insémination artificielle. *Elevage et Insémination*, 1990; 239, 3-15.
- [2] **Feldman EC, Nelson RW. In: Canine and feline endocrinology and reproduction. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1996; pp.785.**
- [3] Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. Inseminação artificial intravaginal com sêmen fresco utilizando a Sonda de Osiris[®] em cães da raça Rottweiler. *Ciência Animal*, 2000, 1, 10, 150-151.
- [4] Uchoa DC, Silva AR, Silva TFP, Silva LDM. Inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Bassethound utilizando a Sonda de Osiris[®]. *Rev. Bras. de Reprod. Anim.*, 2001a; 25, 3, 371-373.
- [5] Uchoa DC, Cardoso RCS, Silva LDM. Comparação de diferentes diluidores de sêmen na inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer: resultados preliminares. *Ciência Animal*, 2002b, 1, 12, 131-134.
- [6] Uchoa DC, Silva AR, Cardoso RCS, Pereira BS, Silva, LDM. Conservação do sêmen canino a 37 °C em diluentes à base de água de coco. *Ciência Rural*, 2002a, 32, 91-95.
- [7] Uchoa DC, Cardoso RCS, Silva LDM. Inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer com diferentes diluidores de sêmen. *Rev. Bras. de Reprod. Anim.*, 2002c, Supl, 05, 150-152.
- [8] Romagnoli S. Canine artificial insemination with fresh, refrigerated and frozen semen. *SPCV ed. Proc. Veterinary Sciences Congress, Oeiras*, 2002; 10-12.

- [9] Betini, CM, Moraes GV, Rigolon LP. Inseminação artificial de cadelas com sêmen fresco diluído em meios formulados com água de coco e leite em pó desnatado. Rev. Bras. de Reprod. Anim.,. 2001;.25, 3, 373-375.
- [10] Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. Uso da sonda de Osiris na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Rottweiler . Rev. Bras. de Reprod. Anim. 2002; 5, 147-149.
- [11] Militão SF, Posso CS, Souza FM. Avaliação de diluidores alternativos para inseminação artificial em capotes (*Numida meleagris*). In: XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Olinda, Proceedings- Abstracts, 1994, p. 534.
- [12] Oliveira LF, Evangelista JF, Bezerra MB, Nunes JF. Água de côco *in natura* adicionada ou não de gema de ovo e sob a forma estabilizada de gel como diluidor do sêmen ovino. In: XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Olinda, Proceedings, 1994; 561.
- [13] Nunes JF. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: Proc. Simpósio da Caprinocultura do Estado do Rio, Niterói., 1986.
- [14] Toniolli R, Mesquita DSM. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. Rev. Bras. Reprod. Anim., 1990; 14, 249-254.
- [15] Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. Efeito da água de coco, gema de ovo e glicerol sobre a qualidade do sêmen canino congelado. UECE ed. Proc. III Semana Universitária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil, 1998; 284 [abst].
- [16] Cardoso RCS. Congelação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco. Master of Sciences Thesis - Fortaleza, State University of Ceará, 2001; 72.

- [17] Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco. *Ciência Rural*, 2002; 35, 2.
- [18] Pereira BS, Uchoa DC, Aquino CA, Silva AR, Cardoso RCS, Cortez, AA, Silva LDM. O efeito do uso de diluentes à base de água de coco no resfriamento do sêmen canino a 4 °C. In: I Simpósio Cearense de Ciência Animal, 1999, Fortaleza, Proceedings, Abstracts 1999; 1, 94.
- [19] Fontenele PS, Cardoso JFS, Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. Conservação s 5°C do sêmen canino diluído em água de coco. *Ciê. Anim.*, 2002, 12, 153-156.
- [20] Pereira BS, Silva AR, Uchoa DC, Cardoso RCS, Silva LDM. Comparação da monta natural e inseminação artificial com sêmen diluído em água de coco em cadelas da raça Boxer. *Revista Ciência Animal*, 2001; 2, 11, 97-100.
- [21] Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. Inseminação artificial intravaginal em cães utilizando-se a Sonda de Osiris® *Ciência Animal*, 2001, 10, 3, 264.
- [22] Uchoa DC, Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. Conservação do sêmen canino a 37°C em um diluidor à base de água de coco ou liquido prostático autólogo. *Rev. Bras. de Reprod. Anim.*, 2003; 27, 3, 324-325.
- [23] Salles MGF. Água de coco (*Cocus nucifera* L.) *in natura*, sob a forma de gel e estabilizada, como diluidor do sêmen caprino. Máster of Sciences Thesis, Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, 1989, 176p.
- [24] Salgueiro CCM, Nunes JF, Oliveira, KPL. Vieira VL, Gondim JM, Mateos-Rex E. Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Rev. Bras. Reprod. Anim., Supl.*, 2002; 5, 96-98.

- [25] Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM. Efeito do método de diluição sobre a qualidade do sêmen canino congelado com diluidor a base de água de coco. In: VIII Semana Universitária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza- Proceedings. Abstract, 2003; 1.
- [26] Cardoso RCS, Silva, AR, Silva LDM. Use of the alternative extender powder coconut water (PCW 106®) for canine semen freezing. In: 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction- Proceedings, 2004;.96-97.
- [27] Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. Comparison between powder coconut water (PCW 106®) and Tris buffer as extenders for canine semen cryopreservation. In: 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Proceedings, 2004; 98-99.
- [28] Braz VB, Araujo AA., Nunes JF, Machado VP, Moura AAA, Oliveira KLP Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. Rev. Bras. de Reprod. Anim., 2003; 27, 3, 328-329.
- [29] Sampaio-Neto JC, Salgueiro CCM, Mateos-Rex E, Nunes JF. Utilization of ACP 105® extender in the refrigeration of stallion semen. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 2002; 5, 137-139.
- [30] Christiansen I J. Reprodução no cão e no gato. São Paulo, Manole Ltda., 1988; 363p.
- [31] Nunes JF. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. Ciência Animal, 1995; 7, 62-69.
- [32] Daurio CP, Gilman MR., Pulliam JD., Seward RL. Evaluation of male Beagles and safety of ivermectin. American Journal of Veterinary Research, 1987; 48, 1755-1760.

- [33] Uchoa DC, Silva AR, Silva LDM. Eficiência da monta natural e da inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas nulíparas da raça Boxer. *Ciência Animal*, 2000; 10, 1,159-160.
- [34] Uchoa DC, Silva AR, Cardoso RCS, Silva TFP, Silva LDM. Avaliação da taxa de parição e prolificidade de fêmeas da raça Boxer submetidas à monta natural ou inseminação artificial. *Ciência Animal*, 2001b; 11, 2, 100-102.
- [35] Nunes JF, Salles FGM. El agua de coco (*Cocus nucifera* L.) "in natura", integral y adicionada com citoquininas, como dilutor de semen caprino. *Rev. Cient.* 1993; 3, 273-281.
- [36] Rodrigues APR, Torres MZG, Oliveira LF, Nunes JF. Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como diluidores do sêmen caprino. In: XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Olinda, Proceedings, 1994; 540.
- [37] Teixeira MDA, Rodrigues APR, Sousa NM, Nunes JF. Avaliação da taxa de degradação da motilidade do sêmen de ovinos deslanados e caprinos, diluídos em água de coco e suas frações. In: XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Olinda, Proceedings, 1994; 589.
- [38] Nunes JF, Combarous Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: I Simpósio de Biotecnologia da Reprodução de Animais Domésticos, Fortaleza, Proceedings, 1995; 53-63.
- [39] Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 2003; 98, 546, 53- 60.

[40] Nunes JF. Coconut water as diluent for goat semen. In: Proc. IV Conferência Internacional Sobre Caprinos, Brasília. 1987.

[41] Sorribas CE. Reproduccion en los animales pequeños. Ed. Intermédica, Buenos Aires,

TABLE 1: Parturition and prolificity rates after natural mating (NM) or artificial insemination using an extender based in *in natura* coconut water (NCW – Group 1) or powdered coconut water (PCW – Group 2).

	Group 1		Group 2	
	NM	AI - NCW	NM	AI - PCW
Parturition	94%	97%	91%	91%
	(64/68)	(66/68)	(61/67)	(61/67)
Prolificity	7.53 ± 0.40	8.21± 0.38	7.16 ± 0.35	7.12 ± 0.43

P > 0.05.

TABLE 2: Mean and standard error of the number of born puppies from each gender after natural mating (NM) or artificial insemination using *in natura* coconut water (NCW – Group 1) or powder coconut water (PCW – Group 2).

Gender	Group 1	Group 2		
	NM	AI – NCW	NM	AI - PCW
Male	3.79 ± 0.21 ^{Aa}	2.76 ± 0.17 ^{Aa}	3.78 ± 0.20 ^{Aa}	2.75 ± 0.18 ^{Aa}
Female	3.73 ± 0.21 ^{Aa}	5.44 ± 0.28 ^{Ba*}	3.37 ± 0.19 ^{Aa}	4.95 ± 0.29 ^{Ba}
Total	7.53 ± 0.40	8.21 ± 0.38	7.16 ± 0.35	7.12 ± 0.43

a, b- Different lower case letters in the same line means statistical difference between groups.

A,B- Different capital letters in the same column represent statistical difference.

* - Statistical difference within the same line, within the same group.

p< 0.05.

TABLE 3: Percentage and total number of male and female puppies born after natural mating (MN) or artificial insemination using in natura coconut water (NCW – Group 1) or powdered coconut water (PCW – Group 2).

	Group 1		Group 2	
	NM	AI - NCW	NM	AI - PCW
Males	50.40% ^{Aac}	33.70% ^{Aad*}	52.71% ^{Aac}	35.66% ^{Aad*}
	(258)	(188)	(253)	(184)
Female	49.60% ^{Aac}	66.30% ^{Bad*}	47.29% ^{Aac*}	64.34% ^{Bad*}
	(254)	(370)	(227)	(332)
Parcial Total	512	558	480	516
Total	1070		996	

a, b- Different lower case letters in the same line means statistical difference between groups.

A,B- Different capital letters in the same column represent statistical difference.

c, d – Different lower case letters in the same line indicate statistical difference between groups.

* - Statistical difference within the same line, within the same group.

p< 0,05.

