

DILUENTES SEMINAIS PARA PEQUENOS RUMINANTES (*Seminal extenders for small ruminants*)

Talita Soares Câmara¹; Thalles Gothardo Pereira Nunes¹; Ricardo Toniolli²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) – FAVET/UECE; ²Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS)/UECE; Av. Dr. Silas Munguba, 1700 Campus Itaperi, Fortaleza-Ce, CEP: 60.740-000.

RESUMO

Visando prolongar a conservação e o uso seminal, muitos diluentes vêm sendo utilizados em pequenos ruminantes, como os convencionais e os alternativos à base de substâncias vegetais, tendo como funções principais a proteção das membranas, a nutrição e a manutenção da pressão osmótica, bem como a multiplicação das doses inseminantes. Desta forma, este artigo tem como objetivo levantar os principais diluentes convencionais e alternativos utilizados na criopreservação seminal em pequenos ruminantes, a fim de maximizar seu uso e promover uma melhor qualidade espermática.

Palavras-chave: caprino, diluente, sêmen, ovino, viabilidade espermática.

ABSTRACT

Looking to prolong preservation and seminal use, diluent muts are used in small ruminants, such as conventional ones and alternative ones based on vegetais substitions, tending as main functions to membrane protection, to nutrição e manutenção da pressão osmótica, bem as a multiplicação You give two inseminants. This way, this article aims to raise the main conventional and alternative diluents used in seminal cryopreservation, in small ruminants, in order to maximize its use and promote a better sperm quality.

Key words: goat, diluent, sheep, sperm viability.

INTRODUÇÃO

Os diluentes seminais têm a função de proteger a membrana do espermatozoide contra os danos provocados pelo choque térmico e pelas injúrias causadas durante o transporte, além de fornecer nutrientes como fonte de energia, ter efeito tamponante, manter a pressão osmótica (285 mOsm) e aumentar o volume do ejaculado, a fim de obter múltiplas doses inseminantes (VERSTEGEN *et al.*, 2005; AISEN, 2008).

Segundo Purdy (2006), um diluente para ser usado na conservação do sêmen deve ter um sistema tampão, como o fosfato de sódio, citrato de sódio, TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano) e o TES (N-tris (hidroximetil) metil 2- aminoetanosulfônico); fontes energéticas, como a glicose, a frutose e crioprotetores externos como a gema de ovo ou o leite, e crioprotetores internos, como o glicerol (GLY) e o etilenoglicol (EG). O diluente

*Endereço para correspondência:
ricardo.toniolli@uece.br

deve ainda apresentar em sua constituição antibióticos, sendo a Penicilina, a Estreptomicina e a Gentamicina, os mais utilizados. Além de ser atóxico para os espermatozoides, ele deve ser de baixo custo e preparo fácil, balanço mineral apropriado, combinação ajustada de nutrientes, bem como proporcionar a estabilidade dos sistemas enzimáticos e a integridade da membrana plasmática (PICKET e AMANN, 1987).

Os diluentes atuais oferecem uma boa proteção à célula espermática, entretanto, com os últimos avanços nas biotécnicas de fecundação, tornou-se possível inferir a baixa fertilidade do sêmen congelado, fundamentalmente à composição dos diluentes, que podem favorecer modificações na distribuição e nas características dos componentes da membrana que cobrem o espermatozoide, resultando na sua desestabilização. Este tipo de problema, está correlacionado ao aumento de fluidez da bi-camada lipídica da membrana, o que a torna mais permeável, favorecendo a entrada de cálcio livre no interior da célula, o qual por sua vez estimula o processo de capacitação espermática (SILVA, 2007).

Desta forma, essa revisão tem como objetivo descrever alguns diluentes seminais convencionais (Tris) e alternativos (leite, água de coco, lecitina de soja), utilizados em pequenos ruminantes, e que tem como finalidade a manutenção da qualidade espermática e o aumento do tempo de utilização do sêmen.

DESENVOLVIMENTO

Diluentes convencionais

O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano - $H_2NC(CH_2OH)_3$) é o principal componente básico dos diluentes utilizados rotineiramente (CHOE *et al.*, 2006; DORADO *et al.*, 2007ab), funcionando como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (McPHAIL e GOODMAN, 1984). Kober (1985, apud RODRIGUES, 1997) reportou que o Tris não apenas apresenta atividade tamponante, mas que também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a economia de sua energia. Davis *et al.* (1963) foram os primeiros pesquisadores a descrever a utilização do tampão TRIS para a conservação do sêmen de bovinos.

Foote (1964) adaptou o uso do diluente à base de tampão TRIS associado ao Citrato de Sódio para a preservação do sêmen na espécie canina. Posteriormente, Maxwell e Watson (1996) reportaram que na conservação de sêmen caprino, utilizando um diluente à base de TRIS-Citrato de Sódio a 5 °C, a capacidade de fertilização *in vitro* dos espermatozoides podia ser mantida por 14 dias.

A solução tampão, denominada Phosphate Buffered Solution (PBS), possui em sua composição sais à base de cloretos e fosfatos, adicionados de componentes energéticos como glicose e piruvato de sódio. Essa solução foi desenvolvida e ainda é largamente utilizada, para a manipulação e cultivo celular, caracterizando-se como uma solução de osmolaridade 280mOsm e pH 7,2 (LIU *et al.*, 1998), portanto, dentro dos padrões indicados para a diluição do sêmen de ovinos (GUIMARÃES, 2010) e caprinos (OLIVEIRA, 2016).

O Ácido Cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) é outra substância que entra na composição de alguns diluentes. Ele possui ação antioxidante e tem sido

utilizado como um conservante natural, sendo também confirmada sua atuação no ciclo de Krebs, importante via da respiração celular, que ocorre nas mitocôndrias. Além disso, em algumas soluções, o ácido cítrico é capaz de servir como doador de prótons, produzindo o citrato, que é largamente conhecido por atuar na estabilização de pH (SILVA, 2006).

Azerêdo *et al.* (2001) relataram que na diluição de sêmen ovino pode ser utilizado o diluente TRIS-gema de ovo, que segundo os autores, por sua proteção aos espermatozoides, este proporciona altas taxas de fertilidade pós-descongelamento. Salviano e Souza (2010), afirmam que na diluição utilizando TRIS-gema de ovo, devem ser adicionados inibidores do crescimento microbiano, fontes nutritivas, fontes estabilizadoras e tamponantes para a manutenção das células espermáticas. A adição de frutose, de lactose e da própria gema do ovo, tem a função de nutrir os espermatozoides. É importante salientar que a gema de ovo também tem propriedades termo-protetoras, protegendo a membrana plasmática e restaurando os fosfolipídios perdidos durante um possível choque térmico, oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento inicial do sêmen. Acredita-se que essa proteção possa ser devido à presença de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina. Durante o choque térmico, estas lipoproteínas interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propiciam a proteção (BOUCHARD *et al.*, 1990).

Além de sua proteção a membrana espermática, a gema de ovo é também conhecida por servir como uma fonte proteica dentro do diluente (SNATOSs, 2004). Outras substâncias têm sido também utilizadas com esse mesmo propósito, tais como o Leite Desnatado (ROTA *et al.*, 2001) e a Albumina Sérica Bovina (BSA) (SIRIVAIDIAPONG *et al.*, 2000). Apesar de seus efeitos benéficos, a gema de ovo apresenta o inconveniente da possibilidade de transmissão de doenças (SILVA *et al.*, 2002). Rodrigues e Rodrigues (1998), realizaram um estudo onde compararam a diluição do sêmen caprino com TRIS-gema de ovo e TRIS-BSA (0,25%, 0,50% e 1,00%). Após o período de criopreservação, foi observada uma perda de motilidade espermática em todos os grupos: 31,58%, 47,39%, 52,69% e 45,69%, respectivamente, sendo observada uma diferença estatística entre o grupo TRIS-gema de ovo e TRIS-BSA 0,50%.

Em alguns estudos têm sido propostos a adição de surfactantes, como o Lauril Sulfato de Sódio (OEP) ao diluente à base de gema de ovo, com uma melhoria da sobrevivência, da motilidade espermática e da manutenção da integridade das membranas plasmática e acrossomal após a descongelamento, refletindo em incremento da fertilidade (AKOURKI *et al.*, 2004).

Maia *et al.* (2008), avaliaram a adição do detergente OEP ao diluente TRIS utilizado para a criopreservação do sêmen de ovinos. Os autores observaram que a motilidade para o sêmen diluído em TRIS (0,5% ou 1,0%) com OEP e em TRIS sem OEP, foi de 65,0%, 69,9% e 34,3%, respectivamente, e que a percentagem de espermatozoides viáveis com membrana plasmática e acrossomal intactas foram de 28,8%, 32,3% e 13,8%, respectivamente.

Diluentes alternativos

Bousseau *et al.* (1998), ao realizarem análises microbiológicas em dois diluentes comerciais de congelamento de sêmen, acrescidos de gema de ovo ou desta associada ao leite,

demonstraram que todas as amostras estudadas, mesmo na presença de associações de antibióticos de largo espectro de ação (penicilina, estreptomicina, lincomicina, espectinomicina ou gentamicina, tilosina, lincomicina e espectinomicina), encontravam-se com contaminação moderada (10-60 CFU/mL) de agentes bacterianos ou destes associados à *mycoplasma*.

Com intuito de minimizar a falta de padronização (GIL *et al.*, 2003), bem como os riscos de contaminação bacteriana (BOUSSEAU *et al.*, 1998), pelo uso de diluentes à base de produtos de origem animal, e de eventuais problemas provenientes da interação plasma seminal e de componentes de diluentes à base de leite e gema de ovo, estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de substituir diluentes com componentes de origem animal pelos de origem vegetal (SALGUEIRO *et al.*, 2002).

Além disso, algumas espécies, como os caprinos, apresentam particularidades que limitam o uso de diluentes ricos em fosfolipídios (LEBOEUF *et al.*, 2000). Isto se dá devido a uma fração glicoproteica (SBUIII) secretadas pelas glândulas bulbouretrais, anteriormente denominada de EYCE (ROY, 1957; NUNES, 1982) e agora denominadas de Fosfolipases A, as quais interagem com diluentes à base de gema de ovo ou leite, induzindo a inibição da motilidade espermática, ruptura do acrossoma e morte celular espermática (PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997). Em virtude disso, muitos pesquisadores sugerem que a gema de ovo e leite devem ser substituídos por crioprotetores livres de fosfolipídios nessa espécie (ROY, 1957).

Água de coco

Inúmeras pesquisas vêm demonstrando o bom potencial da água de coco (*Cocos nucifera*) como diluente seminal em várias espécies. A água de coco é uma solução natural e estéril, composta de sais, proteínas, fatores de crescimento, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhes confere densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo fornecendo os nutrientes necessários para a conservação de células espermáticas (BLUME e MARQUES Jr., 1994).

Diluentes à base de água de coco *in natura* têm apresentado resultados satisfatórios quando utilizados para a conservação de espermatozoides de espécies como cães (CARDOSO *et al.*, 2003), ovinos (MACHADO *et al.*, 2006), caprinos (SALGUEIRO *et al.*, 2002) e suínos (TONIOLLI *et al.*, 2010). Devido as variações físico-químicas da água de coco e a indisponibilidade de frutos em estágios ideais, elaborou-se um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP[®] - ACP Biotecnologia, Fortaleza-Ceará, Brasil), caracterizado pela padronização e estabilização da água de coco, por meio de um processo de desidratação e subsequente formulação de meios de conservação específicos para células e tecidos (SALGUEIRO *et al.*, 2002).

A água de coco, através de experimentos *in vitro* e *in vivo*, exibiu um excelente comportamento no que se refere ao vigor, motilidade e fertilidade dos espermatozoides (NUNES, 1985). Ela é um diluente pobre em fosfolipídios, podendo ser utilizada, por exemplo, na diluição do sêmen caprino, o que permite suprimir os processos de lavagem ao qual é submetido o sêmen antes de diluí-lo nos diluentes convencionais, processo que não precisa ser realizado em ovinos, uma vez que nessa espécie, não ocorrem as mesmas

interações malélicas entre o plasma seminal e os fosfolipídeos presentes no diluente (MACHADO, 1991).

Pesquisadores realizaram o fracionamento da água de coco e observaram uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol acético (IAA), substância com ação hormonal estimuladora do crescimento dos vegetais, que ativa o metabolismo dos espermatozoides aumentando a motilidade e também a taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais longos. A presença do IAA pode variar de acordo com o estágio de maturação e da espécie do coco e conseqüentemente influir nos resultados *in vitro* e *in vivo* do sêmen diluído em diferentes composições da água de coco (NUNES e SALGUEIRO, 1999).

Meios diluentes à base de ACP® têm demonstrado viabilidade na criopreservação seminal de cães (CARDOSO *et al.*, 2007), suínos (TONIOLLI *et al.*, 2010) ovinos (MACHADO *et al.*, 2006), caprinos (SALGUEIRO *et al.*, 2003) e peixes (VIVEIROS *et al.*, 2010). Além dessas vantagens, os meios à base de água de coco têm proporcionado um desvio da proporção entre sexos, sendo que, dos produtos nascidos, a maioria é de fêmeas (UCHOA *et al.*, 2012). Os autores justificam esses achados baseando-se na hipótese de que os componentes da água de coco contribuem para uma redução do tempo de viabilidade dos espermatozoides Y.

Os meios à base de água de coco em pó, tornaram-se uma patente brasileira (ACP Serviços Tecnológicos, Ltda, ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil) e têm sido utilizados para a manutenção da viabilidade e fertilidade espermática em diferentes espécies com resultados satisfatórios (NUNES e SALGUEIRO, 1999) e podem ser uma alternativa mais segura. Entretanto, para a criopreservação espermática com os meios à base de água de coco reconstituída, é necessário acrescentar níveis variados de gema de ovo integral (SILVA *et al.*, 2000), sendo então um fator ainda limitante para a sua utilização, quando se quer substituir os componentes de origem animal. Uma possibilidade é a substituição da gema de ovo integral pela LDL, que se adere à membrana celular durante o processo de criopreservação, essa aderência restabelece a perda de fosfolipídios e, aparentemente, induz uma mudança temporária em sua composição, impedindo assim a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996; MOUSTACAS *et al.* (2011).

Figueirêdo (2006) avaliou a adição de gema de ovo às diluentes água de coco em pó e *in natura*, e observou que esta adição é necessária para a manutenção da integridade e da qualidade do sêmen ovino resfriado a 4 °C, por um período de até dois dias. Oliveira *et al.* (2009) diluíram e congelaram sêmen ovino utilizando água de coco em pó (ACP-101) e TRIS (2,5% e 20% de gema de ovo, respectivamente), sendo analisada a morfologia espermática por esfregaços corados por eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB). Após 5 minutos de TTR não foi verificada alteração morfológica nos espermatozoides avaliados. No entanto após 120 minutos, a maior quantidade de espermatozoides normais foi observada quando se utilizou o TRIS-EN e TRISAB em comparação ao ACP-EN e ACP-AB, sendo de 56,73%, 52,88%, 47,60 e 49,79, respectivamente. Os autores concluíram que o meio à base de TRIS promove maior proteção dos espermatozoides quanto às crioinjúrias, sendo a maior quantidade de gema de ovo presente neste meio a responsável por esta proteção. Esse fato foi confirmado por Cavalcante (2008), quando avaliando o sêmen ovino diluído e o criopreservado em TRIS, e em água de coco em pó

(ACP-102), observou que na incubação por um período de 2 horas a 37 °C após a descongelação o percentual de espermatozoides móveis foi de 62,8% e 40,3%, respectivamente.

Em um estudo realizado por Campos (1999), para verificar a viabilidade do diluente à base de água de coco criopreservado a -196 °C, para a congelação do sêmen caprino, constatou-se que o mesmo se comportou como ótima alternativa possibilitando seu uso em regiões onde inexista o coqueiro, bem como facilitando o armazenamento, conservação e transporte desta solução.

Nunes e Salgueiro (1999), observaram que o sêmen de animais da raça Saanen diluído em água de coco e refrigerado a 4 °C, manteve-se viável durante 48 horas e com qualidade superior ao sêmen dos mesmos animais refrigerado em diluente à base de leite desnatado.

A refrigeração do sêmen de caprino a 4 °C, utilizando diluentes à base de água de coco, tem mostrado bons resultados. Nunes e Silva (1984), demonstraram que o sêmen de caprinos da raça Anglo Nubiana diluído em água de coco e refrigerado a 4 °C permaneceu viável por um período de 10-12 horas. Oliveira *et al.* (1996), utilizando diluente refrigerado a 4 °C, à base de água de coco, alcançaram 50% de fertilidade em cabras nativas, bem como da raça Saanen, através de IA

Assim em cabras nativas inseminadas com sêmen refrigerado da raça Saanen, diluído em água de coco-gema-glicerol, obteve-se taxas de fertilidade de até 54% para o sêmen conservado em refrigeração durante 24 horas. A adição de glicerol ao sêmen diluído em água de coco-gema não afeta a cinética dos espermatozoides (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2002).

Leite desnatado

Os diluentes à base de leite desnatado (CORTEEL, 1974) e tris-gema (SALAMON e RITAR, 1982; SINGH *et al.*, 1995) são os mais utilizados na congelação do sêmen de bodes. Segundo Salamon e Maxwell (2000), o leite é um meio isotônico, contendo muitos componentes favoráveis à manutenção e conservação da viabilidade do espermatozoide. O sucesso desse diluente tem sido atribuído à sua fração proteica, que pode atuar como tampão, contra mudanças do pH e como agente quelante, contra a presença de metais pesados no meio. Cunha (2002), afirma que o leite possui abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozoides na produção de energia. Sabe-se que duas substâncias responsáveis por essas características são: a lactose, que age como elemento energético e a caseína que é uma substância capaz de potencializar a atividade cinética dos espermatozoides.

Souza *et al.* (2006), citam o uso de um diluente à base de leite em pó desnatado para a congelação do sêmen ovino, mas recomendam a adição do antibiótico gentamicina na concentração de 13,3 mg/mL, visando controlar a contaminação bacteriana nas amostras. Dorado *et al.* (2007) demonstraram que amostras de sêmen ovino congeladas neste diluente promovem taxas de gestação superiores àquelas obtidas com o TRIS. Aboagla e Terada (2003), demonstraram o uso de um diluente à base de Trealose e gema de ovo, para a criopreservação do sêmen de caprinos e verificaram após descongelação, a

motilidade espermática de 73% e a motilidade progressiva de 57%, enquanto os resultados para Tris-citrato-gema ficaram em 59% e 46%. Vale ressaltar que a Trealose é um substrato energético, que auxilia na manutenção da pressão osmótica do diluente, atuando como crioprotetor, protegendo assim a célula contra desidratação e processos envolvidos na criopreservação de modo geral, porém maiores estudos são ainda necessários com esse diluente.

Carvalho *et al.* (2008), estudaram o efeito dos diluentes TRIS-Gema (TG), Leite-Gema (LG) e TRIS-Gema-Leite (TGL) sobre a diluição e a criopreservação de sêmen ovino. Foi observado que no diluente TG, os espermatozoides apresentaram motilidade progressiva (46,5%) superior às células nos diluentes LG (26,1%) e TGL (32,1%), após a descongelação. Os mesmos autores também observaram que a percentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesadas após a descongelação não diferiu entre os diluentes TG (29,8%), LG (24,3%) e TGL (30,1%).

O sêmen caprino diluído em leite e refrigerado a 15 °C mantém sua viabilidade por até 12 horas do que quando refrigerado a 5 °C. Nessa temperatura mais baixa, pode-se manter um nível aceitável de fertilidade com o sêmen conservado por até 48 horas (EVANS e MAXWELL, 1987). Os testes de determinação da qualidade de movimento e de porcentagem de espermatozoides móveis as 2, 4, 6, 8 e 24 horas de incubação a 15 °C, mostraram valores mais altos nos espermatozoides conservados em diluente à base de água de coco, do que nos diluídos em leite desnatado (NUNES *et al.*, 1994). No método de Corteel (1987), o leite desnatado com 14% de glicerol é adicionado a 4°C em três passos, com intervalo de 10 minutos, resultando em uma concentração final de glicerol de 7% e uma concentração espermática de 400 a 500 x10⁶ espermatozoides por mL. No método de Ritar e Salamon (1982), o diluente à base de TRIS com glicerol é adicionado ao sêmen não-lavado em um passo a 30 °C, sendo a concentração final de glicerol e gema de ovo de 4% e 20%, respectivamente, no sêmen diluído (EVANS e MAXWELL, 1987). A adição de glicerol a 5 °C não apresentou vantagens sobre a adição a 30 °C (TULI e HOLTZ, 1994).

Lecitina de Soja

Em busca de solucionar ou reduzir os danos causados pela presença de agentes microbianos, em diluentes de origem animal para congelação seminal, aliada a falta de padronização desses aditivos, que podem apresentar grande variação nas suas composições (GIL *et al.*, 2003b), estimularam o desenvolvimento de diluentes comerciais formulados à base de lecitina de soja, como uma alternativa à utilização da gema de ovo e do leite (Biociphos[®] e Bioexcell[®], IMV, L'Aigle, France) e com índices de fertilidade semelhantes àqueles do sêmen de bovinos e ovinos criopreservados com os meios convencionais (GIL *et al.*, 2000a; GIL *et al.*, 2003b; FUKUI *et al.*, 2008).

Apesar dos resultados positivos obtidos, com a utilização dos meios à base de lecitina de soja, para a congelação do sêmen ovino e bovino, Bittencourt *et al.* (2008a) encontraram baixos índices de congelabilidade do sêmen de caprinos ao utilizarem o meio Bioexcell[®]. Os autores relataram taxas de motilidade espermática de 27% com este diluente, valor inferior ao observado com TRIS gema (47%) no mesmo trabalho e inferior também aos 56% relatados por Gil *et al.* (2003a), ao utilizar o mesmo diluente. Contudo, é

importante ressaltar as diferenças na metodologia empregada para a congelação do sêmen, uma vez que Gil *et al.* (2003a) utilizaram a metodologia rotineiramente empregada na Suécia, com a diluição do sêmen em duas etapas, adicionando a fração do diluente com glicerol somente após o resfriamento do sêmen à temperatura de 5 °C, tanto para o diluente Bioexcell quanto para o leite-gema de ovo.

No estudo desenvolvido por Bittencourt *et al.* (2008a), para todos os grupos experimentais, foi utilizado o método de diluição em uma etapa, já com a concentração final de glicerol. Esse fato sugere que melhores resultados com a utilização do Bioexcell® para a congelação do sêmen podem ser obtidos empregando-se a diluição em duas etapas.

No trabalho com ovinos, desenvolvido por Gil *et al.* (2003a), comparando a eficácia do Bioexcell® em relação a um diluente convencional à base de leite-gema de ovo, foram observados índices de fertilidade semelhantes entre as ovelhas inseminadas com o sêmen congelado nos diferentes protocolos. Taxas de fertilidade similares também foram observadas por Fukui *et al.* (2008), após inseminação das ovelhas com o sêmen congelado em meio TRIS gema (64%), BSA (58%) e a base de lecitina (56%) (Andromed®, Minitub, Tiefenbach, Alemanha). Em trabalho posterior, a mesma equipe (HIWASA *et al.*, 2009), após induzir a superovulação das ovelhas, obteve bons índices de estruturas fertilizadas (81%) e taxas de prenhez (72%), por meio de inseminação laparoscópica em tempo fixo com sêmen congelado com o Andromed®.

Ao comparar a fertilidade do sêmen congelado e refrigerado com dois diluentes comerciais à base de lecitina de soja, Khalifa *et al.* (2013) obtiveram melhores resultados de fertilidade com o Bioexcell® (77%), em relação ao Andromed® (66%), com a inseminação artificial de mais de 600 ovelhas multíparas não lactantes. Os autores observaram a existência de interação entre o diluente, a idade do reprodutor e sua fertilidade.

Com o uso de sêmen de animais jovens (1,5 a 2,5 anos), congelado com Bioexcell®, obteve-se melhores resultados do que o congelado com Andromed®. Esse fato não se repetiu para animais mais velhos (4,5 a 5,5 anos). Já Akay *et al.* (2012), não observaram diferenças significativas, quanto aos parâmetros espermáticos *in vitro* (motilidade, integridade da membrana plasmática e acrossomal), quando o sêmen foi congelado com Andromed® ou Bioexcell®. Gil *et al.* (2003a) ressaltam que o diluente à base de lecitina de soja, sem aditivos de origem animal, pode ser uma alternativa segura quando o sêmen congelado for utilizado para a introdução de um novo material genético em rebanhos diferentes e principalmente, em um outro país.

Outros diluentes

Diluentes à base de óleos vegetais

Del Valle *et al.* (2013) realizaram um estudo na tentativa de substituir a gema de ovo por substratos de origem vegetal no meio diluente. Eles testaram dois óleos vegetais como fonte de lipídios para o meio de congelação do sêmen ovino, o óleo de coco e o óleo de palma, em diferentes concentrações. Entretanto, o sêmen congelado no diluente com 20% de gema de ovo proporcionou os melhores resultados nos testes *in vitro*.

Diluentes à base de lipoproteína de baixa densidade

De acordo com alguns trabalhos, a lipoproteína de baixa densidade (LDL), seria a molécula que conferiria o efeito crioprotetor à gema de ovo (PACE e GRAHAM, 1974; QUINN *et al.*, 1980). A LDL é composta por um centro lipídico (triglicérides e colesterol) rodeado por um filme de fosfolipídios e proteínas (90% de lipídios e 10% de proteínas) (COOK e MARTIN, 1969). A partir de então, iniciaram-se os estudos para extração dessa fração da gema de ovo para a congelação do sêmen de diferentes espécies, tendo-se como referência o trabalho de Moussa *et al.* (2002), que padronizaram uma técnica de extração de alta aplicabilidade, elevada eficiência e grau de pureza (97%). Esse mesmo estudo determinou que a concentração de LDL no diluente ideal é de 8%, superior aos meios à base de lecitina de soja e gema de ovo.

O efeito protetor da LDL é justificado, pois, com o processo de congelação, essas moléculas se rompem fornecendo fosfolipídios e colesterol à membrana plasmática, conferindo estabilidade e inibindo as crioinjúrias derivadas do processo, além de se ligar à algumas proteínas do plasma seminal inibindo sua toxicidade (MOUSSA *et al.*, 2002). Na concentração de 8%, além de melhores índices de motilidade, de integridade da membrana plasmática e acrossomal, a LDL ainda favorece maior atividade dos antioxidantes seminiais, em comparação com outras concentrações e meios à base de gema de ovo integral (HU *et al.*, 2011).

Trabalhos demonstraram que a LDL extraída da gema pode ser submetida à radiação gama, com o intuito de minimizar a carga microbiana, sem alterar a sua composição (PILLET *et al.*, 2011). Assim, os índices de viabilidade espermática e de fertilidade têm sido superiores ou semelhantes quando a LDL é utilizada em substituição à gema de ovo para congelar o sêmen de diferentes espécies, tais como bovinos (MOUSSA *et al.*, 2002), equinos (PILLET *et al.*, 2011), suínos (HU *et al.*, 2009) e caninos (BENCHARIF *et al.*, 2008) e assim, potencialmente, poderia ser uma alternativa para a congelação do sêmen de outras espécies.

Com este objetivo, Moustacas *et al.* (2011) trabalharam com a LDL nas concentrações de 8, 12, 16 e 20%, em substituição à gema de ovo integral na espécie ovina, na concentração de 16%, liofilizada ou não. Os autores não verificaram diferenças entre o grupo controle com gema integral e os grupos com LDL natural, embora a liofilização não tenha proporcionado resultados estatisticamente superiores e satisfatórios, seu uso torna-se uma alternativa importante para a criopreservação de sêmen ovino, especialmente se a LDL for submetida a técnicas de esterilização, previamente a sua incorporação nos meios diluentes.

Diluentes à base de albumina sérica bovina (BSA)

Matsuoka *et al.* (2006) relataram que a BSA pode substituir a gema de ovo nas concentrações de 10 e 15 mg/mL, uma vez que melhora a motilidade, a integridade da membrana e do acrossoma. Eles avaliaram diferentes concentrações de BSA (0; 0,3; 15; 10 e 15%) no meio de congelação do sêmen ovino, sem gema de ovo. O sêmen congelado com 10 e 15% de BSA, apresentou os maiores índices de motilidade espermática pós-descongelação, em relação aos demais grupos estudados, inclusive quando comparado ao

meio à base de frutose com 20% de gema de ovo. Estes resultados estão de acordo com os observados nos trabalhos de Fukui *et al.* (2007, 2008), que ao congelarem o sêmen de ovinos com os meios TRIS-gema de ovo (15%) ou BSA (10%) sem gema de ovo, obtiveram taxas de fertilidade semelhantes (64 e 66% com TRIS-gema *versus* 58 e 65% com BSA, respectivamente), nas fêmeas inseminadas em tempo fixo. Já Uysal e Bucak (2007), relataram que a melhor concentração de BSA é de 20 mg/mL. BSA elimina os radicais livres gerados por ROS, e, portanto, conservam a integridade da membrana e a integridade dos espermatozoides durante o processo de congelação e descongelação.

Esses achados indicam que a BSA pode substituir a gema de ovo nos meios de congelação do sêmen ovino, sem comprometer os índices de fertilidade. O trabalho de Gutiérrez *et al.* (2006) com sêmen ovino congelado demonstrou que a adição de 10% de BSA, em meio contendo 50% de água de coco e 50% de solução de citrato de sódio a 2,9%, possibilitou melhores índices de manutenção da viabilidade espermática pós descongelação, quando comparado com meio sem BSA ou com este em maiores concentrações, entretanto, apesar da utilização de menores percentuais de gema de ovo que o convencional (14%).

CONCLUSÕES

A obtenção de bons índices de viabilidade seminal é possível, desde que a formulação do diluente leve em consideração as características fisiológicas do sêmen da espécie (pH, tolerância osmótica, composição da membrana plasmática), como também a variabilidade individual.

Diluentes alternativos à base de substratos de origem vegetal possibilitam um maior controle sanitário do produto, especialmente quando se pretende introduzir o material biológico em diferentes rebanhos dentro do país ou exportá-lo.

Outro fator importante é o estabelecimento de meios quimicamente definidos, minimizando os riscos da falta de padronização da composição química obtida quando se utiliza a gema de ovo integral e o leite desnatado para a confecção dos meios de congelação, já que esses podem sofrer variações importantes de acordo com a origem.

REFERÊNCIAS

ABGOALA, E.M.E.; TERADA, T. Effect of the supplementation of trehalose extender contain egg yolk with sodium dodecyl sulfate on freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.809-818, 2004.

AKAY, E.; KULAKSIZ, R.; DASKIN, A.; CEBI, C.; TEKIN, K. The effect of different dilution rates on post-thaw quality of ram semen frozen in two diferente egg-yolk free extenders. *Slovenian Veterinary Research*, v.49, p.97-102, 2012.

AKOURKI, A.; GIL, L.; ECHEGARAY, A.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; DE BASS, I.; GONZALEZ, N.; GALLEGOS DE LA HOYA, M.; MEQUE, L.C. Effect of the extender

supplement Equex-STM on cryopreserved semen in the Assaf sheep. *Cryo Letters*, v.25, n.2, p.147-154, 2004.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.7, p.145-173, 1987.

AZERÊDO, G.A.; ESPER, C.R.; RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen tawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research*, v.41, p.257-263, 2001.

BENCHARIF, D.; AMIRAT, L.; ANTON, M.; SCHIMITT, E.; DESHERCES, S.; DELHOMME, G. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, v.70, p.1478-1488, 2008.

BETINI, C.M.; MORAES, G.V.; RIGOLON, L.P. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. *Acta Science*, v.20, p.361-365, 1998.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; BISCARDE, C.E.; LEAL, L.S.; OBA, E. O efeito de um quelante de cálcio, de um detergente e da lecitina de soja sobre a congelabilidade do sêmen caprino. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.45, p.305-312, 2008a.

BLUME, H.; MARQUES Jr, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.18, p.97-104, 1994.

BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K.; SIKES, J.D.; YOUNGQUIST, R.S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology*, v.34, p.147-157, 1990.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUAN-LE GUIENNE, B.; GUERIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. *Theriogenology*, v.50, p.699-706, 1998.

CAMPOS, A.C.N. A água de coco criopreservada, proveniente de frutos de diferentes variedades e idades de maturação como diluidor do sêmen caprino. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 45p., 1999.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M.; CHIRINE, V.H.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm oocyte interaction assay. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, p.11-16, 2007.

CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., UCHOA, D.C, SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, v.59, p.743-751, 2003.

CAVALCANTE, J.M. Avaliação do sêmen ovino diluído e congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-102c) ou Tris. 2008.89p. *Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)* – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, Ce, 2008.

COOK, W.H.; MARTIN, W.G. Egg lipoproteins. In: TRIA, E.; SCANU, A.M. Structural and Functional Aspects of Lipo-proteins in Living Systems, Academic Press, London, p.346, 1969.

CORTEEL, J.M.; BARIL, G.; LEBOEUF, B. Development and application of artificial insemination with deep frozen semen and out-of season breeding of goats in France. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4, 1987, Anais... Brasília, 1987, v.1, p.523-547.

CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoides de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal: effet du glucose (viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect). Annales de Biologie Animal, Biochimie et Biophysique, v.14, p.741-745, 1974.

CUNHA, I.C.N. Criopreservação do sêmen de cães. Tese Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.149p., 2002.

DAVIS, I.S; BRATTON, R.W; FOOTE,R.H. Livability of bovine spermatozoa at 50, -25 e -85 °C in Tris-buffered and citrate-buffered yolk glycerol extenders. Journal of Dairy Science, v.46, p.333-336, 1963.

DEL VALLE, I.; SOUTER, A.; MAXWELL, W.M.C.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PEREZ, J.A. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. Animal Reproduction Science, v.138, n3-4, p.213-219, 2013.

DORADO, J.; RODRIGUEZ, I., HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. Theriogenology, v.68, p.168-177, 2007.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. London: Butterworth. 1987. 194p.

FARSTARD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. Animal Reproduction Science, v.42, p.251-260, 1996.

FIGUEIRÊDO, E.L.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W.U.; PINHEIRO, J.H.T.; CAMPOS, A.C.N.; SANTOS, R.R.; MEDEIROS, C.H.N. Fertilidade de cabras inseminadas artificialmente com sêmen refrigerado a 4 °C e conservado por até 24 horas. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.5, p.118-120, 2002.

FIGUEIRÊDO, E.L. Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco no Estado do Ceará. 2006. 61p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, Ce. 2006.

FOOTE, R.H.; ARRIOLA, J. Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. Journal of Dairy Science, v.70, n.12, p.2642-2647, 1987.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M. FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility of ewes inseminated with intrauterinally

- with frozen semen using extender containing bovine serum albumin. *Journal of Reproduction and Development*, v.53, n.4, p.959-962, 2007.
- FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, v.54, n.4, p.286-289, 2008.
- GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, v.54, n.1, p.93-108, 2000.
- GIL, J; LUNDEHEIM, N; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, v.59, n.5-6, p.1241-1255, 2003b.
- GIL, J; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, n.5-6, p.1157-1170, 2003a.
- GUIMARÃES, A.A. Avaliação de diferentes diluentes na criopreservação de sêmen ovino (*Ovis aries*). 2010. 74p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2010. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
- GUTIÉRREZ, A.J.; COSME, R.W.; JIMÉNEZ, C.J.A.; RAMÍREZ, G.J.A. Coconut milk, bovine fetal serum, *Aloe vera* and their combinations for cryopreservation of ovine semen. *Archivos de Zootecnia*, v.55, n.209, p.101-104, 2006.
- HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; OKABE, K.; FUKUI, Y. Fertility after different Artificial Insemination Methods Using a Synthetic Semen Extender in Sheep. *Journal of Reproduction and Development*, v.55, n.1, p.50-54, 2009.
- HU, J.H.; JIANG, Z.L.; LV, R.K.; LI, Q.W.; ZHANG, S.S.; ZAN, L.S.; LI, W.K.; LI, X. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*, v.62, p.83-87, 2011.
- KHALIFA, T.; LYMBEROPOULOS, A.; THEODOSIADOU, E. Association of soybean-based extender with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-blind parallel group design. *Theriogenology*, v.79, n.3, p.517-527, 2013.
- KOBER, C. Vergleichend Untersuchungen von Verdünnern zur Spermakonservierung bei Schwein, Pferd und Hund unter besonderer Berücksichtigung physikalischer Eigenschaften. Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierlinik der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, 119p. (Tese de Doutorado), 1985.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.
- MACHADO, R. Inseminación artificial con semen congelado en caprinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.3, p.265-276, 1991.

- MACHADO, V.P.; NUNES, J.F.; ARAÚJO, A.A.; FERNANDÉZ, D.R.P.; CORDEIRO, M.A.; MEDEIROS, C.H.N.; MEDEIROS, A.L.N.; MONTEIRO, A.W.U. Fertility following intracervical or intrauterine laparoscopic insemination of ewes using extenders based on coconut water. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.43, p.43-49, 2006.
- MAIA, M.S.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L. Efeito da adição do Equex-STM ao diluente TRIS-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, supl.1, p.311-311, 2005.
- MATSUOKA, T.; IMAI, H.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, v.52, n.5, p.675-683, 2006.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.55-65, 1996.
- MCPHAIL, D.B., GOODMAN, B.A. Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems. *Biochemical Journal*, v.221, p.559-560, 1984.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.
- MOUSTACAS, V.S.; ZAFFALON, V.G.; LAGARES, M.A.; LOAIZA-ECCHEVERRI, A.M.; VARAGO, F.A.; NEVES, M.M.; HENEINE, L.G.D.; ARRUDA, R.P.; HENRY, M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, v.75, p.300-307, 2011.
- NUNES, J. Etude des effets du plasma séminal sur la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc., 33p. These de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie. Paris, 1982.
- NUNES, J.F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.6, p.329-342, 1985.
- NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; PRISCILA, L. Utilisation d'une substance active "JYP" présente dans l'eau de coco pour la conservation "in vitro" et la fertilité des spermatozoïdes de mammifères. S.I.: Sn. 1994.
- NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluente do sêmen de caprinos e ovinos. *Revista Científica de Produção Animal*, v.1, n.1, p.17-46, 1999.
- NUNES, J.F.; SILVA, A.E.F.D. Tecnologia do sêmen resfriado em caprinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.8, n.2, p.121-127, 1984.
- OLIVEIRA, L.F.; AZEVEDO JÚNIOR, A.R.; TEIXEIRA, M.D.A.; ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F. Desempenho reprodutivo de cabras exóticas e SRD sincronizadas e inseminadas com sêmen refrigerado e diluído em água de coco. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1996, Anais... Fortaleza, 1996.
- OLIVEIRA, R.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; CAVALCANTE, J.M.M.; MOURA, A.A.A.M.; ARAÚJO, A.A. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos

diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou Tris, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.3, p.862-869, 2009.

OLIVEIRA, C.T.S.A.M. Criopreservação de sêmen caprino em diferentes concentrações espermáticas associada ou não a melatonina. Viçosa, Minas Gerais, 2016. 48p.

PACE, M.M., GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*, v.39, p.1144-49, 1974.

PELLICER-RUBIO, M.T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biology of Reproduction*, v.57, p.1023-1031, 1997.

PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F.; BEAUMAL, V.; ANTON, M. DESHERCES, S.; SCHIMITT, E.; MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, v.75, p.105-114, 2011.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research.*, v.63, p.215-225, 2006.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protect ram spermatozoa from cold shock at the plasma membrane site. *Journal of Reproduction Fertility*, v.60, p.403-407, 1980.

RITAR, A.J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent and the survival of fresh and frozen spermatozoa of Angora goat. *Australian Journal of Biological Sciences*, v.35, p.305-312, 1982.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Efeito da adição de diferentes concentrações de Albumina Sérica Bovina (BSA) ao diluidor à base de Tris sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.26, n.2, p.32-49, 1998.

ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, n.15, p.1415-1420, 2000.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, v.179, p.318-319, 1957.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.77-111, 2000.

SALAMON, S.; RITAR, A.J. Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, v.35, p.295-303, 1982.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO, M.A.; MAGALHÃES, D.M.; CAVALCANTE, J.M.M.; PALÁCIO, A.R.S. Evaluation quality of goat semen after thawing by Hypoosmotic Test. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.3 p.377-378, 2003.

- SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.L.P.; VIEIRA, V.L.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilization of extenders based on coconut water “in natura” and in powder on the does artificial insemination at fixed time. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.5, p.96-98, 2002.
- SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, n.3, p.159-167, 2008.
- SANTOS, I.W. Albumina sérica bovina como fonte proteica do diluidor Tris(hidroxi metil amino metano) para congelação do sêmen canino. 2004. 63p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 2004.
- SILVA, A.F.; COSTA, E.P.; OLIVEIRA, F.A.; TORRES, C.A.A.; HASS, G.T.S.; NASCIMENTO, V.A. Uso da dimetil-formamida associada oúnão com glicerol na criopreservação de sêmen caprino. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n.2, p.452-456, 2006.
- SILVA, A.R., CARDOSO, R.D.C.S.; SILVA, L.D.M.D. Canine semen's freeze with diferente concentrations of egg yolk and glycerol in TRIS and coconut water extenders. *Ciência Rural*, v.30, n.6, p.1021-1025, 2000.
- SILVA, T.A.S.N. Efeito do plasma seminal na descongelação do sêmen ovino avaliado *in vitro* e na inseminação artificial cervical. 2007.64p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília. Brasília. 2007.
- SINGH, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K. Effect of cyoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, v.43, p.1047-1053, 1995.
- SIRIVAIDYAPONG, S., CHENG, F.P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W.F.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology*, v.53, p.789-802, 2000.
- SOUZA, A.F., GUERRA, M.M.P., COLETO, Z.F., MOTA, R.A., SILVA, L.B.G., LEÃO, A.E.D.S., SOBRINHO, E.S.N. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.43, p.329-336, 2006.
- TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G.H.; FRANCESHINI, P.H.; MORATO, F.M.A.C. Uso do diluente água de coco em pó (ACP-103[®]) na conservação prolongada do sêmen do varrão: avaliação *in vitro* e *in vivo*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, p.1072-1079, 2010.
- TULI, R.K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.42, p.547-555, 1994.
- UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; CARDOSO, J.F.S.; MOTA FILHO, A.C.; JUCÁ, R.P.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). *Theriogenology*, v.77, n.9, p.1959-1963, 2012.

UYSAL, O.; BUCAK, M.N. Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. v.6, p.1362-1366, 2007.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*, v.64, p.720-733, 2005.

VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; ORFÃO, L.H.; ISAÚ, ZA. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, v.74, p.551-556, 2010.