



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

CARLA PATRÍCIA MOTA ARAGÃO

**MORFOMETRIA DA CABEÇA DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS
DILUÍDOS E CRIOPRESERVADOS EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE
COCO EM PÓ (ACP-101c)**

**FORTALEZA-CEARÁ
2011**

CARLA PATRÍCIA MOTA ARAGÃO

MORFOMETRIA DA CABEÇA DE ESPERMATOZOIDES
CAPRINOS DILUÍDOS E CRIOPRESERVADOS EM MEIO À BASE DE
ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-101c)

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 título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

Co-orientadora: Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro.

FORTALEZA-CEARÁ
2011

A659m Aragão, Carla Patrícia Mota

Morfometria da cabeça de espermatozoides caprinos diluídos e criopreservados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) / Carla Patrícia Mota Aragão. – Fortaleza, 2011.

72 p.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

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

1. Caprino. 2. Sêmen. 3. Água de coco em pó. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.39

CARLA PATRÍCIA MOTA ARAGÃO

MORFOMETRIA DA CABEÇA DE ESPERMATOZOIDES
CAPRINOS DILUÍDOS E CRIOPRESERVADOS EM MEIO À BASE DE
ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-101c)

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 título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 31 / 03 / 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ferreira Nunes
(Orientador)
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Dr^a. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
(Examinadora – Co-orientadora)
ACP Biotecnologia

Prof^ª. Dr^a. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley
(Examinadora – Membro Efetivo)
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Dr^a. Gyselle Viana Aguiar
(Examinadora – Membro Externo)
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO

A todos aqueles que acreditaram em mim e na minha capacidade, e a todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

A toda a minha família, em especial minha mãe, meu marido, minha filha, pela inspiração.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por ter me dado uma força interna sobrenatural, sem a qual nada seria possível!

À Universidade Estadual do Ceará, à Faculdade de Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela oportunidade, pelos conhecimentos adquiridos e pela chance de chegar até o fim dessa caminhada.

Ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino que, através do uso de suas instalações e equipamentos, foi possível a conclusão do experimento.

Ao Professor Doutor José Ferreira Nunes, por acreditar, por orientar, pelo carinho, por não me fazer desistir e pelos conhecimentos passados durante os dois anos do Mestrado. Muito obrigada Professor!

À Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pelo apoio, estímulo, amizade, pela sensibilidade aos meus problemas pessoais e pelos conhecimentos transmitidos. Obrigada, Cristiane!

À Professora Dra. Carmina Sandra Brito Salmito-Vanderley, pessoa fantástica, amiga e sensível. Obrigada de coração pelas orientações, apoio e carinho!

Ao Professor Dr. Cláudio Cabral Campello, pela realização da estatística, dedicação e atenção ao projeto.

À minha querida mãe, que é o próprio amor em forma de pessoa. A pessoa mais doce, mais amável, mais terna que conheci em toda a minha vida. Gostaria de ser pelo menos um pouquinho do que a Senhora é para mim para a minha filha. Amo a Senhora! Sempre!

Ao Ivan, meu marido, meu companheiro, meu cúmplice e principalmente meu amigo. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos, colegas de trabalho (Lúcio Flávio e Ana Márcia) e funcionários, que somente com o apoio destas pessoas consegui terminar essa etapa da vida!

Ao amigo José Maurício Maciel Cavalcante que me deu apoio, ensinou, ajudou e muito contribuiu para esse trabalho. Obrigada mesmo!

Aos amigos que reencontrei e aos amigos que conheci no mestrado: Cibele, Hiédely, Eudes, Oscar, Bárbara...

Aos alunos de iniciação científica: Sérvulo (obrigada!), Brandinice, Juliana, Natália, Poliana, que me ajudaram muito para a realização desse trabalho! Podem contar comigo!

Aos integrantes do Núcleo Integrado de Biotecnologia, em especial dona Iraci, Márcia, Sarah, Henna, Gonzaga (estamos com saudades) e a mais nova integrante Dr^a Gyselle (obrigada pelo apoio, amizade e ajuda fundamental!).

Ao pessoal dos carnívoros e dos peixes (em especial Cássia, Audália e Lili). Vocês foram muito legais comigo!

E, claro, aos principais integrantes, os animais, que me ajudaram na concretização do experimento.

Por fim, a todos aqueles que, contribuíram indiretamente para essa nova conquista, meus sinceros agradecimentos. Obrigada.

“Talvez seja este o aprendizado mais difícil: manter o movimento permanente, a renovação constante, a vida vivida como caminho e mudança.”

Maria Helena Kuhner

RESUMO

A morfologia normal dos espermatozoides pode ser um indicador do potencial de fertilização dos mesmos, entretanto a criopreservação pode alterar as dimensões dos espermatozoides na espécie caprina. O objetivo do trabalho foi avaliar os diluentes ACP-101c e TRIS quanto aos parâmetros morfológicos e morfométricos do sêmen caprino fresco diluído e criopreservado, utilizando a análise de sêmen auxiliada por computador (CASA). Foram utilizados quatro caprinos e as colheitas de sêmen foram realizadas com uso de vagina artificial, duas vezes por semana, totalizando 28 ejaculados válidos. Em cada coleta o sêmen obtido dos quatro caprinos foram reunidos em um *pool*, divididos em duas alíquotas, diluídos em ACP-101c e TRIS e criopreservados. Foram realizados esfregaços tanto para o sêmen fresco diluído, como para o descongelado em ACP-101c e TRIS, em seguida corados com eosina-nigrosina para análise morfológica e viabilidade, e com o kit Panótico CBC (Instant-Prov) para análise morfométrica no módulo de morfometria do sistema CASA. Avaliou-se 100 espermatozoides corretamente digitalizados por lâmina para os parâmetros de tamanho (comprimento, largura, área e perímetro da cabeça) e parâmetros de forma (elipicidade, alongação, rugosidade, regularidade). Não foram encontradas diferenças estatísticas no percentual de células viáveis entre o sêmen fresco diluído e o descongelado nos diluentes ACP-101c e TRIS, entretanto o sêmen criopreservado em ACP-101c mostrou resultados significativamente superiores ao diluente TRIS ($p < 0,05$). Em relação à morfologia, o diluente TRIS apresentou valores superiores quanto aos defeitos de peça intermediária. Os parâmetros morfométricos relacionados à dimensão do espermatozoide do sêmen fresco diluído foram superiores ao sêmen descongelado quanto ao comprimento, área e perímetro no diluente ACP-101c e largura no diluente TRIS. Em relação aos parâmetros de forma do espermatozoide, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os diluentes ACP-101c e TRIS, exceto na regularidade que foi inferior no sêmen descongelado, para ambos os diluentes. O diluente ACP-101c apresentou-se superior ao TRIS na conservação da morfologia espermática na análise subjetiva, entretanto a criopreservação afetou alguns dos parâmetros morfométricos de dimensão no diluente ACP-101c. Conclui-se que o diluente ACP-101c apresenta-se favorável à conservação de espermatozoides frescos e criopreservados de caprinos.

Palavras-chave: Caprino. Sêmen. Água de coco em pó. Morfologia. Morfometria.

ABSTRACT

Normal morphology of spermatozoa may serve as an indicator of their fertilizing potential, but cryopreservation may alter the dimensions of goat spermatozoa. This study aimed at evaluating the extenders PCW-101c and TRIS, considering morphologic and morphometric parameters of fresh diluted and cryopreserved goat semen, through Computer-Assisted Semen Analysis (CASA). Four bucks were assessed and semen collections were performed twice a week, by using an artificial vagina, obtaining a total of 28 valid ejaculates. For each collection, semen obtained from four bucks were mixed in a pool, divided into two aliquots, diluted with PCW-101c and TRIS and cryopreserved. Smears of diluted fresh and thawed semen diluted with PCW-101c and TRIS were made and stained with eosin-nigrosine to analyze sperm morphology and viability, and stained with panoptic to analyze sperm morphometry through CASA system. One hundred correctly digitalized spermatozoa per smear were evaluated, considering size (length, width, area and head perimeter) and shape (ellipticity, elongation, rugosity and regularity). No statistical differences were observed in the percentage of viable cells between diluted fresh and cryopreserved semen, with PCW-101c presenting significantly superior results, when compared to TRIS ($p < 0,05$). Concerning morphology, TRIS presented superior values, considering intermediate piece defects. Morphometric values related to the size of the sperm from fresh diluted semen were superior to thawed semen, concerning length, area and perimeter when using PCW-101c, and width, when using TRIS. Concerning sperm shape, no statistical differences were observed between the extenders PCW-101c and TRIS, except for sperm regularity, which was inferior for thawed semen, using both extenders. PCW-101c showed to be superior to TRIS for the conservation of spermatic morphology, considering the subjective analysis. However, cryopreservation affected most of the morphometric parameters of size, even when using the extender PCW-101c. It can be concluded that the extender PCW-101c contributes to the conservation of fresh and cryopreserved goat spermatozoa.

Keywords: Goat. Semen. Powder coconut water. Morphology. Morphometry.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Percentual de espermatozoides viáveis do sêmen caprino fresco diluído e criopreservado em ACP-101c e TRIS, corados com eosina-nigrosina.....	52
TABELA 2	Distribuição do percentual de espermatozoides normais e com alterações morfológicas do sêmen caprino fresco diluído e criopreservado em ACP-101c e TRIS.....	53
TABELA 3	Distribuição do percentual das alterações morfométricas quanto aos parâmetros de dimensão do sêmen caprino fresco diluído e criopreservado em ACP-101c e TRIS, avaliados pelo CASA.....	54
TABELA 4	Distribuição do percentual das alterações morfométricas quanto aos parâmetros de forma do sêmen caprino fresco diluído e criopreservado em ACP-101c e TRIS, avaliados pelo CASA.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Características de um espermatozóide sem a membrana plasmática. A cabeça com o capuchão acrossomático e a cauda com suas quatro divisões anatômicas. Cortes transversais da peça intermediária, peça principal (2) e peça da cauda mostram o núcleo do axonema central de 9 + 2 microtúbulos, as nove fibras grossas externas, a bainha mitocondrial, as colunas longitudinais ventral e dorsal e as costelas circulares.....	20
FIGURA 2	Água de Coco em Pó (ACP®).....	35
 <i>Capítulo 1</i>		
FIGURA 1	Análise morfométrica da cabeça de espermatozóide de caprino diluído em ACP-101c, antes (a) e após (b) a digitalização.....	51

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Composição da água de coco em pó (ACP), estabelecidos mediante análises em laboratórios de referência certificados pela ANVISA e INMETRO (dados fornecidos pela empresa ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará), 2010.....	35
----------	---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACIN	: Água de coco <i>in natura</i>
ACP	: Água de coco em pó
ACP-101c	: Meio para congelação de sêmen caprino à base de água de coco em pó
A	: Área
ANOVA	: Análise de Variância
C	: Comprimento
CASA	: Análise de Sêmen Auxiliada por Computador
CASMA	: Análise Morfométrica de Sêmen Auxiliada por Computador
I.A.	: Inseminação Artificial
IAA	: Ácido 3-indol acético
L	: Largura
MIP	: Motilidade Individual Progressiva
mOsm	: Miliosmoles
MP	: Motilidade Progressiva
MT	: Motilidade Total
P	: Perímetro
NIB	: Núcleo Integrado de Biotecnologia
PEM	: Percentagem de Espermatozoides Móveis
pH	: Potencial Hidrogeniônico
PPGCV	: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
SCA	: <i>Sperm Class Analyzer</i>
Sptz	: Espermatozoide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	O sêmen e os espermatozoides.....	18
2.2	Avaliação da qualidade seminal.....	20
2.2.1	Técnicas básicas.....	21
2.2.2	Análise do sêmen auxiliada por computador.....	26
2.2.2.1	Parâmetros morfológicos e morfométricos.....	27
2.3	Diluição seminal.....	30
2.3.1	Diluentes de criopreservação.....	31
2.3.2	Diluentes à base de água de coco.....	33
3	JUSTIFICATIVA.....	38
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	39
5	OBJETIVOS.....	40
6	CAPÍTULO 1. Efeitos da criopreservação sobre a morfologia e morfometria de espermatozoides de caprinos diluídos em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c).....	41
7	CONCLUSÕES.....	56
8	PERSPECTIVAS.....	57
9	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade econômica explorada em todos os continentes, estando presente em áreas sob as mais diversas características climáticas, edáficas e botânicas. No entanto, somente em alguns países esta atividade apresenta expressão econômica, sendo, na maioria dos casos, desenvolvida de forma empírica e extensiva, com baixos níveis de tecnologia (RIBEIRO, 1997).

A produção de um rebanho é influenciada pelos índices reprodutivos. Um aumento de fertilidade e da prolificidade terá como consequência um incremento imediato na produção de leite, através de um maior número de fêmeas em lactação, e de carne e pele, devido a um maior número de crias nascidas. Neste contexto, a inseminação artificial apresenta-se como ferramenta para acelerar o incremento na eficiência reprodutiva e a produtividade do rebanho, através da utilização de sêmen de reprodutores selecionados.

O uso de sêmen diluído e criopreservado conserva sua capacidade fecundante por longos períodos de armazenamento, contribuindo significativamente em programas de melhoramento genético.

Para a conservação seminal, faz-se uso de diluentes. Em 1985, Nunes realizou os primeiros estudos utilizando a água de coco *in natura*. Devido aos resultados obtidos, objetivou-se a elaboração de um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP), caracterizado pela padronização e estabilização da água de coco *in natura* através de um processo de desidratação e subsequente formulação de meios de conservação específicos para espermatozoides.

A avaliação seminal consistia, até recentemente, em uma avaliação subjetiva da motilidade espermática, associada a análises da morfologia dos espermatozoides. Com o advento dos sistemas de análise seminal auxiliada por computador (CASA), passou-se a obter informação acurada da motilidade de cada

espermatozoide, além de ser possível a realização de análises objetivas dos parâmetros morfológicos, morfométricos e de fragmentação de DNA.

Entretanto, até o momento, poucos são os relatos na literatura sobre os protocolos de criopreservação que utilizem o ACP como meio diluente na espécie caprina, bem como relatos sobre as avaliações do comportamento do sêmen caprino neste meio segundo o parâmetro morfometria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O sêmen e os espermatozoides

O sêmen é o produto da ejaculação de um reprodutor, sendo composto por espermatozoides, células responsáveis pela fecundação dos óvulos das fêmeas, as quais são produzidas nos testículos, e por uma fração líquida denominada plasma seminal, produzida pelas glândulas acessórias e pelos epidídimos do sistema genital masculino (CORTELL, 1981).

Os espermatozoides são formados a partir do desenvolvimento de células germinativas presentes no interior dos túbulos seminíferos, estes se derivam a partir das espermatogônias que se diferenciam em espermatócitos primários, secundários e espermatídes até chegarem a espermatozoides, numa sequência de eventos denominada espermatogênese que é regulada pela secreção de testosterona a partir das células de Leydig (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A estrutura do espermatozoide é formada por cabeça, colo, peça intermediária e flagelo, sendo este último subdividido em peça principal e peça terminal (BARTH e OKO, 1989). A cabeça do espermatozoide é formada principalmente pelo núcleo. Entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo existe o acrossoma, uma estrutura de dupla camada de membranas que contém enzimas (hialuronidase e acrosina) responsáveis pela destruição do *cumulus oophorus* e da zona pelúcida do oócito durante a fecundação (BEARDEN e FUQUAY, 1992). O colo é a região que liga a cabeça à peça intermediária, que como no flagelo, tem em sua constituição, dois microtúbulos centrais, circundados por nove microtúbulos duplos, que é a constituição específica dos flagelos. Circundando esta estrutura, existem outras nove formações: as fibrilas densas externas. Revestindo a peça intermediária, existe uma bainha mitocondrial e uma bainha fibrosa, enquanto que o flagelo é revestido apenas pela bainha fibrosa (MIES FILHO, 1987). A movimentação da cauda se dá pelo deslizamento entre os microtúbulos, cuja energia para tal é

proveniente de uma bainha de mitocôndrias que recobre a peça intermediária (BARTH e OKO, 1989) (Fig. 1).

O plasma seminal é a porção fluida do sêmen, incorporada durante a ejaculação e formada por uma mistura de líquidos secretados pelas glândulas sexuais acessórias (vesiculares, bulbouretrais e próstata), pelos epidídimos e pelos ductos deferentes (EVANS e MAXWELL, 1990). Atua como veículo para os espermatozoides serem transportados do trato genital do macho, ativa a sua motilidade e proporciona um meio rico em nutrientes e tamponado, necessário para manter a sobrevivência dos espermatozoides após sua deposição no trato genital feminino (EVANS e MAXWELL, 1990). Normalmente, apresenta pressão osmótica semelhante ao sangue e possui pH neutro (UPRETI et al., 1995).

O plasma seminal contém uma variedade de constituintes bioquímicos, alguns dos quais são relativamente específicos dentro do mecanismo de regulação da função do espermatozoide, entretanto as exatas funções destes componentes seminais no controle da motilidade espermática, ainda não estão bem elucidadas (STREZEZEK et al., 1992). O contato com o fluido seminal desencadeia eventos preparatórios nos espermatozoides para a fertilização (MÜLLER et al., 1997), pois os constituintes do plasma seminal são conhecidos por modular uma variedade de funções espermáticas (CALVETE et al., 1994).



Figura 1. Características de um espermatozoide sem a membrana plasmática. A cabeça com o capuchão acrossômico e a cauda com suas quatro divisões anômicas. Cortes transversais da peça intermediária, peça principal (2) e peça da cauda mostram o núcleo do axonema central de 9 + 2 microtúbulos, as nove fibras grossas externas, a bainha mitocondrial, as colunas longitudinais ventral e dorsal e as costelas circulares (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

2.2 Avaliação da qualidade seminal

A avaliação *in vitro* da qualidade seminal é uma alternativa na tentativa de avaliar a fertilidade de um grande número de machos (MARTINEZ et al., 2000), sendo complementar ao exame clínico de um reprodutor (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

Classicamente, o julgamento da qualidade seminal tem sido baseado em uma avaliação subjetiva de parâmetros como motilidade massal e individual, sendo

estas consideradas uma expressão da viabilidade e integridade estrutural dos espermatozoides (VERSTENGEN et al., 2002).

Segundo Neves et al. (2008), os ejaculados deverão ser analisados quanto aos itens: volume em mL, medido pela leitura direta no copo coletor, ou em pipeta de vidro graduada, variando de 0,2 a 2 mL nos bodes; aspecto, mediante avaliação visual, sendo a cor amarelada nesta espécie e podendo ter aspecto cremoso, leitoso, opalescente, seroso ou aquoso dependendo da concentração espermática; turbilhonamento ou movimento de massa que é um movimento em forma de ondas observado em uma gota de sêmen, sendo o resultado da motilidade, vigor e da concentração espermática; motilidade espermática, expressa em percentual conforme a proporção de espermatozoides que apresentam movimento; o vigor espermático, que representa a força do movimento que acaba influenciando a velocidade com que os espermatozoides se movimentam; concentração espermática; morfologia espermática; provas de integridade de membrana e teste de termorresistência.

2.2.1 Técnicas básicas

No que diz respeito às avaliações microscópicas, a concentração espermática pode ser determinada com auxílio de espectrofotometria ou de microscopia, utilizando-se a câmara de Neubauer (SANTOS et al., 2006). O valor normal da concentração espermática para caprinos está em torno de 3×10^9 /mL, podendo variar entre 2,5 a $5,0 \times 10^9$ /mL. Avalia-se ainda a presença do turbilhonamento (motilidade massal), que é o movimento da massa de espermatozoides no plasma seminal (0 – 5) e a motilidade individual progressiva (MIP), que representa o movimento em flecha de cada espermatozoide individualmente, variando de 0 a 5, sendo que para a criopreservação, deve ser utilizado somente sêmen com valor acima de 3. (NEVES et al., 2008; HAFEZ e HAFEZ, 2004). Quanto à avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis e motilidade individual progressiva, o sêmen deve ser diluído para visualização individualizada dos espermatozoides (EVANS e MAXWELL, 1990; CHEMINEAU et al., 1991; CBRA, 1998).

Os espermatozoides podem apresentar três principais movimentos identificáveis subjetivamente: progressivo, circular e oscilante (EVANS e MAXWELL, 1990).

O exame da morfologia é um dos itens componentes do exame espermático no contexto de uma avaliação andrológica. Os ejaculados apresentam certa porcentagem de defeitos na sua morfologia, mas que não interferem na fertilidade do reprodutor. Por outro lado, acima de determinados níveis, sua utilização compromete os resultados de um programa de inseminação ou inviabiliza a criopreservação espermática (NEVES et al., 2008).

A morfologia espermática pode ser avaliada através de preparação úmida e de esfregaços corados (BEARDEN e FUQUAY, 1992). DERIVAUX (1980) relata que as anormalidades espermáticas podem afetar, isolada ou simultaneamente, as diferentes regiões da cabeça, peça intermediária e peça principal.

Ejaculados com baixa porcentagem de anormalidades morfológicas antes da criopreservação têm, em média, os melhores valores dos parâmetros motilidade e velocidade pós-descongelção. A grande correlação entre as variáveis de motilidade, formas anormais e integridade de acrossoma encontradas no sêmen fresco podem ser consideradas como preditoras úteis de um comportamento espermático semelhante após a criopreservação (DORADO et al., 2009).

Segundo Hafez e Hafez (2004), as morfoanomalias podem ser: primárias, decorrentes de falhas na espermatogênese; secundárias, que ocorrem durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo; e terciárias, que se produzem durante a ejaculação, depois desta, ou pelo manejo inadequado da amostra. As morfoanomalias primárias estão relacionadas com defeitos de forma e tamanho da cabeça e da peça intermediária, além de flagelo muito enrolado ou dobrado e às gotas citoplasmáticas proximais; e as secundárias, às cabeças normais separadas, às gotas citoplasmáticas distais e aos flagelos encurvados. Posteriormente, as patologias espermáticas passaram a ser classificadas como defeitos maiores ou menores, caracterizados pela gravidade dos seus efeitos deletérios à fertilidade (NÖTHLING e IRONS, 2008).

As alterações de cabeça são relacionadas quanto à forma, dimensão, duplicação e acrossoma; as de peça intermediária quanto a sua amplitude, dimensão, duplicação, fratura e inserção e, as flagelares, quanto ao tamanho, calibre, enrolamentos, dobraduras e duplicações, além da presença de gotas citoplasmáticas no espermatozoide (DERIVAUX, 1980).

O acrossoma pode apresentar vários defeitos, como *Knob defect*, enrugado e destacado. Sendo, a maioria, identificados por irregularidades em sua margem (CHENOWETH, 2005). Os vários níveis de cauda dobrada e enrolada estão entre os defeitos espermáticos mais comuns (CHENOWETH, 2005).

Kato et al. (1996), sugeriram que a maioria das gotas citoplasmáticas no sêmen caprino se desprende durante o trânsito pela uretra e/ou imediatamente após a ejaculação e que sua desintegração ocorre em poucos minutos. Sua presença na peça intermediária é uma das principais causas de infertilidade em suínos (THUNDATHIL et al., 2001).

Existe correlação entre a morfologia espermática, particularmente em relação ao acrossoma e a fertilidade (FOOTE, 2003), entretanto, é altamente variável, sendo dependente da qualidade do sêmen examinado e a metodologia empregada na avaliação (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005). As anormalidades espermáticas podem reduzir a fertilidade por não permitir a chegada do espermatozoide ao local da fecundação, bem como incapacitar a fecundação ou o desenvolvimento embrionário inicial (CHENOWETH, 2005).

Segundo Chenoweth (2005), as anormalidades espermáticas podem ser causadas, principalmente, por fatores ambientais e/ou genéticos. Silva e Nunes (1988) observaram maior ocorrência de patologias espermáticas, no sêmen caprino, durante a época seca e em bodes com bolsa escrotal sem bipartição.

Oyeyemi et al. (2006) estudaram a quantidade de anormalidades morfológicas que podem ocorrer com ejaculações sucessivas em caprinos e concluíram

que a ejaculação frequente resulta em liberação de espermatozoides imaturos, devido ao aumento de anormalidades primárias, especialmente gota citoplasmática.

Singh et al. (1995), avaliaram o sêmen caprino congelado em TRIS-gema-glicerol e observaram 45% de motilidade progressiva, constatando alterações morfológicas principalmente relacionadas ao acrossoma e flagelo. Soyly et al. (2003) constataram 9,1% de defeitos totais em esfregaços de sêmen caprino fresco corados por eosina-nigrosina. Já Gubartallah et al. (2005) observaram, no esfregaço de caprinos Saanen, uma média de 15,49% de espermatozóide mortos e 8,56% de anormalidades espermáticas.

Oliveira et al. (2009) analisando o efeito do diluente ACP-101 e TRIS sobre a morfologia espermática do espermatozóide caprino aos cinco minutos pós-descongelação encontraram valores para a porcentagem de espermatozoides normais de 64,54 para ACP-101 e 61,79 para TRIS, encontrando nos espermatozoides anormais, um percentual de patologias de cabeça de 27,13 e 31,25, de peça intermediária de 1,06 e 0,92; e de flagelo de 5,85 e 5,35 para os diluentes ACP-101 e TRIS, respectivamente.

Os principais problemas relacionados com os métodos tradicionais para a análise da morfologia espermática são a subjetividade e a variabilidade (BAKER e CLARKE, 1987; OMBELET et al., 1997), tornando difícil a interpretação acurada e a comparação entre os laboratórios (KRUGER et al., 1988).

A avaliação da morfologia espermática é influenciada por muitos fatores, como as técnicas de coloração e fixação (SANCHO et al., 1998; HIDALGO et al., 2006), manipulação do sêmen, qualidade do microscópio e a habilidade do avaliador, provavelmente sendo esta o fator mais importante.

A integridade da membrana espermática é um atributo essencial para a fertilidade do espermatozoide e, por isso, a análise deste parâmetro é fundamental para a predição da fertilidade (LUZ et al., 2000).

A viabilidade espermática está relacionada à integridade da membrana plasmática (EVANS e MAXWELL, 1990; CHEMINEAU et al., 1991). Esta pode ser avaliada através de colorações vitais, onde os espermatozoides que possuem integridade de membrana (vivos), não são corados e os que possuem danos na membrana (mortos) permitem a entrada do corante no citoplasma (DERIVAUX, 1980; BEARDEN e FUQUAY, 1992). Dentre os corantes utilizados podemos citar, além da eosina-nigrosina (DERIVAUX, 1980; EVANS e MAXWELL, 1990; CHEMINEAU et al., 1991; BEARDEN e FUQUAY, 1992), o azul de tripan, Giemsa (BEARDEN e FUQUAY, 1992) e azul de bromofenol (DERIVAUX, 1980).

De modo semelhante, a integridade do acrossoma é pré-requisito básico para garantir um bom potencial de fertilidade dos espermatozoides, uma vez que o percentual de espermatozoides que apresentam prévia reação acrossomal possui correlação negativa com a fertilidade (GIL et al., 2003). É possível a ocorrência de lesões do acrossoma durante a congelação e descongelação, sem que isto interfira na motilidade espermática (TASSERON et al., 1977).

Brito et al. (2003) avaliaram a integridade do plasmalema do sêmen descongelado de bovinos, através das colorações vitais eosina-nigrosina e azul de tripan e, através de colorações fluorescentes, observaram uma alta correlação entre as colorações vitais e fluorescentes, entretanto, as últimas foram mais sensíveis para identificar os danos de membrana. Pintado et al. (2000) constataram equivalência na proporção de espermatozoides, suínos e bovinos não viáveis identificados comparando colorações vitais de citossol com sondas fluorescentes.

O teste de termorresistência (TTR) é utilizado para avaliar o comportamento (motilidade e vigor) dos espermatozoides quando incubados a 37 °C por determinado tempo e, desta forma, predizer a fertilidade seminal (BARNABE et al., 1981). O teste hiposmótico (HOST) foi originalmente elaborado para uso com espermatozoides humanos e tem a função de avaliar a atividade bioquímica da membrana espermática intacta. Esse teste baseia-se na observação de que um espermatozoide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução

hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelular. Com o influxo da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular (edema), com posterior dobramento da cauda (JEYENDRAN et al., 1984).

A avaliação subjetiva tem reduzido a predição da fertilidade devido à alta variabilidade observada entre avaliadores. Assim, variação de 30-60% tem sido registrada na estimação da motilidade no mesmo ejaculado. Desta forma, a ênfase é dada para o desenvolvimento de métodos de avaliação objetivas (ANEL et al., 2006).

Mack et al. (1988) ressaltaram que a necessidade de uma metodologia objetiva, motivou a elaboração e desenvolvimento de instrumentos automatizados capazes de analisar as trajetórias dos espermatozoides.

Os ensaios tradicionais de avaliação seminal podem ser suficientes quando é aplicada a inseminação artificial (IA) cervical com sêmen refrigerado, pois há um elevado número de espermatozoides por dose (ANEL et al., 2006). Entretanto, melhor estimação da qualidade espermática é requerida quando o sêmen congelado é utilizado (ANEL et al., 2006). Além disso, em situações específicas (problemas de subfertilidade, avaliação acurada de machos, etc.), estas técnicas são insuficientes devido a sua alta subjetividade, baixa sensibilidade e pobre correlação com a fertilidade a campo (ANEL et al., 2006). Desta forma, novas técnicas de análise e avaliação do sêmen são necessárias, como a análise seminal auxiliada por computador (CASA).

2.2.2 Análise do sêmen auxiliada por computador

A necessidade de se obter uma análise objetiva e acurada da trajetória (MACK et al., 1988) e da morfologia espermática (VERSTEGEN et al., 2002) levou ao desenvolvimento de sistemas de análise de sêmen auxiliado por computador (CASA). A Análise de Sêmen Auxiliada por Computador (CASA) é definida como um sistema automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozoides, fornecendo informação acurada, precisa e significativa do

movimento individual de cada espermatozoide e também resumos estatísticos da população espermática (AMANN e KATZ, 2004). A automatização desta análise permite maior objetividade e rapidez, uma vez que esta é realizada numa fração do tempo requerido pela avaliação subjetiva (MORTIMER, 1997).

Os sistemas CASA têm sido considerados tanto objetivos como acurados na detecção de súbitas diferenças nas dimensões das cabeças de espermatozoides de várias espécies animais (GRAVANCE et al., 1996; RODRIGUEZ et al., 2004; HIDALGO et al., 2005), incluindo caprinos (GRAVANCE et al., 1995; HIDALGO et al., 2005), diferenças estas que seriam imperceptíveis nas técnicas de visualização microscópicas tradicionais.

2.2.2.1 Parâmetros morfológicos e morfométricos

A morfologia normal dos espermatozoides pode ser um indicador do potencial de fertilização do mesmo, porém, a avaliação subjetiva tem mostrado considerável variação entre avaliadores. O desenvolvimento da análise morfométrica do sêmen assistida por computador (CASMA), tem permitido reduzir esta variação e revelar sutis diferenças entre indivíduos que não podem ser detectados usando métodos subjetivos (ANEL et al., 2006).

Devido à precisão do CASMA, a morfometria da cabeça do espermatozoide pode ser um indicador de alterações reprodutivas e de animais subfêrteis, uma vez que as dimensões dos espermatozoides de animais férteis são homogêneas. As diferenças nas dimensões em animais subfêrteis têm sido verificadas em equinos (CASEY et al., 1997). Entretanto, mais que a média do tamanho da cabeça dos espermatozoides, o grau de variação nas dimensões dos espermatozoides é o melhor preditor da fertilidade em humanos e bovinos (KATZ et al., 1986; SAILER et al., 1996).

Estudos utilizando CASMA têm demonstrado que a criopreservação reduz as dimensões dos espermatozoides nas mais diversas espécies como caprinos (HIDALGO et al., 2006; MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006), bovinos (GRAVANCE et al., 1998a; RUBIO-GUILLÉN et al., 2007), equinos (ARRUDA et al., 2002) e suínos

(GARCIA-HERREROS et al., 2007). Este efeito tem sido explicado por alguns mecanismos como mudanças osmóticas durante a criopreservação, danos acrossomais e alterações na condensação da cromatina (GRAVANCE et al., 1998a; HIDALGO et al., 2006; GARCIA-HERREROS et al., 2007).

As dimensões morfométricas apresentam relações com os protocolos de congelação. A área, bem como o formato do espermatozoide, têm importantes implicações na criopreservação do sêmen por influir nas trocas térmicas e no fluxo de água e íons durante a congelação e são os principais determinantes na taxa ótima de congelação (CURRY et al., 1996). Estes et al. (2006) afirmam que cervídeos, cujo sêmen era caracterizado como congelável ou não congelável, apresentaram diferenças morfométricas no sêmen fresco, mas não em outros parâmetros de qualidade seminal como percentual de espermatozoides móveis, integridade de membrana e acrossoma, sendo razoável supor que as variações na morfologia espermática podem influenciar as características biofísicas dos espermatozoides que são essenciais para o sucesso da criopreservação.

Outra importância do CASMA é permitir distinguir diferentes subpopulações de espermatozoides numa amostra (NÚÑEZ-MARTINEZ et al., 2007), uma vez que a susceptibilidade para a capacitação e habilidade de fertilização variam segundo estas subpopulações (WILLIAMS e FORD, 2001). Desta forma, subpopulações de espermatozoides podem ser definidas segundo a morfometria da cabeça do espermatozoide e a distribuição destas subpopulações pode estar relacionada com a fertilidade (ANEL et al., 2006). De modo semelhante, Thurston et al. (2001) detectaram subpopulações morfologicamente distintas de espermatozoides suínos, cuja proporção no ejaculado correlacionou com a análise da qualidade seminal após criopreservação. A análise de sêmen deveria contemplar a presença de subpopulações e não apenas fornecer valores médios para a população de espermatozoides como um todo (SANCHO et al., 1998).

Nos estudos de Gravance et al. (1997) não foram encontradas diferenças significativas das dimensões das cabeças dos espermatozoides obtidas por dois diferentes técnicos, indicando uma alta repetibilidade dos resultados do CASMA.

Gravance et al. (1995) não encontraram diferenças quando analisaram a cabeça dos espermatozoides de caprino utilizando as objetivas de 20x, 40x e 60x. A análise dos espermatozoides em uma objetiva de menor aumento diminuiu significativamente o tempo de realização das análises (GRAVANCE et al., 1995).

Os resultados obtidos durante a análise do sêmen também podem ser afetados por um número insuficiente de espermatozoides analisados (GRAVANCE et al., 1997). Na análise morfométrica de espermatozoides humanos, pelo menos 200 células devem ser avaliadas para se obter uma estimativa acurada do percentual de células normais. Gravance et al. (1995) não encontraram diferenças na análise dos parâmetros morfométricos quando 100 ou 200 cabeças de espermatozoides de caprino foram analisadas. Entretanto, a análise de 50 cabeças de espermatozoides mostrou diferenças significativas nas mensurações e uma grande variação comparada com a análise de um número maior de células. A avaliação de um número mínimo de espermatozoides que sejam suficientes para uma determinação acurada de suas dimensões de cabeça e o aumento do campo microscópico com a redução da objetiva de aumento, aumentando o número de espermatozoides por campo, pode economizar tempo na análise (GRAVANCE et al., 1995; GRAVANCE et al., 1997).

É notório que o perfil da cabeça dos espermatozoides pode ser relacionado com a organização da cromatina espermática. Além disso, potenciais problemas no DNA podem resultar em alterações no padrão da cabeça dos espermatozoides, detectados pelo CASMA (ANEL et al., 2006). Núñez-Martinez et al. (2007) encontraram significativa correlação entre as variáveis morfométricas e a quantidade de DNA desnaturado no ejaculado canino, uma vez que a distribuição morfométrica de subpopulações foi similar àquela derivada da integridade do DNA. A variação da morfologia espermática é um indicador da estrutura anormal da cromatina e conseqüentemente, da fertilidade (KARABINUS et al., 1997).

Em ovinos, alguns estudos têm sido realizados de modo a desenvolver métodos acurados no emprego do CASMA (GRAVANCE et al., 1998a) e outros têm analisado o efeito da criopreservação na cabeça do espermatozoide (LAMBRECHTS et al., 2000). Entretanto, a possível relação entre o CASMA e a fertilidade precisa de comprovação na espécie ovina (ANEL et al., 2006).

2.3 Diluição seminal

Os diluentes permitem o aumento do volume total do ejaculado, facilitando sua divisão em doses inseminantes e proporcionando um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro* (DERIVAUX, 1980). Diferem em sua composição dependendo da espécie animal, da origem do sêmen e da tecnologia seminal empregada (HOPKINS e EVANS, 1991).

Hafez e Hafez (2004) sugerem que um diluente deve proporcionar nutrientes como fonte de energia; proteger os espermatozoides do efeito maléfico do frio; proporcionar um meio tampão; manter a pressão osmótica adequada; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do ejaculado e proteger as células espermáticas durante a congelação.

Alguns diluentes mantêm a viabilidade do sêmen à temperatura ambiente, enquanto que outros são apropriados para refrigeração entre 4 e 5 °C para ajudar a controlar o crescimento bacteriano e reduzir a taxa metabólica das células espermáticas (HOPKINS e EVANS, 1991).

A dose inseminante preconizada para o sêmen de bodes, em inseminação cervical, é de 200×10^6 espermatozoides, em um volume de 0,25 a 0,50 mL. O volume adequado para a inseminação cervical e intrauterina seria de 0,50 a 0,20 mL, respectivamente (EVANS e MAXWELL, 1990).

2.3.1 Diluentes de criopreservação

Os diluentes para congelação devem possuir uma substância que atue como crioprotetor externo e que proteja as células contra o choque térmico que se produz ao

refrigerar o sêmen desde os 20 °C aos 5 °C, tal como a gema de ovo ou leite desnatado; uma fonte de energia, como a glicose ou frutose; um componente tampão, como citrato de sódio ou o hidroximetil aminometano (TRIS); um crioprotetor interno que proteja aos espermatozoides durante a congelação, a exemplo do glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol; e antibióticos para prevenir o crescimento bacteriano, como a penicilina, estreptomicina ou gentamicina (EVANS e MAXWELL, 1987).

A maioria dos diluentes apresenta a gema de ovo como componente básico, já que a fosfatidilcolina (lecitina) e lipoproteínas da gema e a caseína do leite protegem os espermatozoides durante a refrigeração, contra o choque térmico (MIES FILHO et al., 1982; DAS e RAJKONWAR, 1995).

A congelação do sêmen de caprinos apresenta dificuldades comuns à de outras espécies, como: formação de cristais de gelo intra e extracelulares e aumento da concentração de solutos (MATEOS-REX e AGUILLAR, 1996). Porém existe um fator a mais a ser considerado que é o fato das glândulas bulbouretrais do bode produzirem particularmente, uma fosfolipase (EYCE) que hidrolisa a lecitina da gema de ovo, formando ácidos graxos e lisolecitina, esta última atua sobre a membrana espermática, danificando-a (ROY, 1957). Nunes (1982), descobriram a existência de uma fração protéica do plasma (BU-III), procedente das glândulas bulbouretrais, que interage com o leite, produzindo inibição da motilidade espermática e induzindo a reação acrossômica. É provável que a EYCE e a BU-III sejam a mesma molécula (LEBOUF et al., 2000).

Roca et al. (1997) observaram que a eliminação do plasma seminal, em caprinos, imediatamente depois da coleta, aumenta a porcentagem de células vivas e sua motilidade durante sua conservação a 5 °C em diluentes contendo gema de ovo ou leite.

Já Viana et al. (2006), comparando o sêmen caprino lavado e não lavado, diluído em TRIS-gema e leite desnatado, refrigerado a 4 °C, não observaram alteração

da motilidade espermática e patologias de acrossoma após a remoção do plasma seminal.

Cabrera et al. (2005), determinando o efeito da remoção do plasma seminal e gema de ovo sobre a congelabilidade do sêmen caprino, relataram que a concentração da gema no diluente foi mais relevante que o efeito de lavagem, e que não houve diferenças significativas no sêmen descongelado com dois dias, dois ou seis meses de armazenamento em nitrogênio líquido. Estes autores ressaltaram que interação negativa de diluentes contendo gema de ovo sobre o sêmen de bodes é mais relacionada a caprinos criados em áreas de clima temperado e durante a estação não reprodutiva. Bodes criados em latitudes menores do que 30° normalmente não apresentam diferenças na atividade reprodutiva, como consequência da influência da estação do ano. Nestas áreas, o fotoperíodo tem pequenas flutuações anuais, sendo assim, as variações reprodutivas são mais influenciadas pelo clima, umidade e disponibilidade de alimentos (PÉREZ e MATEOS, 1996).

O glicerol é um crioprotetor interno ou penetrante que reduz os danos da membrana espermática e formação de gelo intracelular, mas as concentrações podem interferir na capacidade de fecundação dos espermatozoides (PURDY, 2005). As concentrações de glicerol utilizadas por diferentes pesquisadores variam de 3% a 9%, com o ótimo de 4-7% no sêmen diluído (LEBOUF et al., 2000).

A diluição do sêmen não lavado pode ser feita em duas fases, a primeira depois da coleta (30 °C) com um diluente que não contenha glicerol, e a segunda depois da refrigeração (4-5 °C) com o diluente contendo glicerol, seguido de um tempo de equilíbrio de 90 minutos antes da congelação (RITAR e SALAMON, 1982).

O uso de diluentes pobres em fosfolipídios pode contribuir para a biotecnologia da criopreservação do sêmen caprino, suprimindo os processos de lavagens pelo qual o sêmen deve passar antes de ser diluído nos diluentes convencionais (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1991).

Dentre as alternativas, surgiu a água de coco, mostrando através de experimentos *in vitro* e *in vivo* um excelente comportamento de fertilidade (NUNES, 1986).

2.3.2 Diluentes à base de água de coco

A água de coco é uma solução ligeiramente ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, carboidratos, vitaminas, gorduras neutras (MARQUES, 1982; NUNES e COMBARNOUS, 1995), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporcionando os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade de gametas masculinos e femininos criopreservados (BLUME e MARQUES JR., 1994).

Nunes et al. (1997) observaram que o fruto ideal recomendado para a formulação do diluente deve ter seis meses de idade. Entretanto, nesta idade, a água apresenta pH ácido (4,5) e osmolaridade elevada (500 mOsm/Kg H₂O) o que dificultaria a sobrevivência celular. Logo, tornou-se necessária a estabilização desta solução, que foi obtida após a adição de água destilada e citrato de sódio a 5%, constituindo assim o diluente água de coco *in natura* (ACIN).

Nunes (1986, 1987), avaliando o sêmen caprino após duas horas de incubação a 37 °C, observou que tanto a motilidade individual progressiva (MIP) como a porcentagem de espermatozoides móveis (PEM) eram superiores quando o sêmen se diluía em uma solução à base de água de coco que em leite desnatado. A motilidade individual progressiva dos espermatozoides diluídos em água de coco, quando comparados aos diluídos em leite glicosado, foi superior ao final de duas horas de incubação (NUNES e SALGUEIRO, 1999).

Resultados similares foram obtidos ao utilizar ambos os diluentes na refrigeração de sêmen a 4 °C e em seu uso para inseminação artificial de cabras que se haviam sincronizado o estro com tratamentos hormonais. Com o uso da IA com sêmen

caprino diluído em água de coco e refrigerado a 4 °C se obtiveram taxas de parição superiores a 60% (NUNES, 1986).

Tratando de determinar a fração da água de coco que atua sobre os espermatozoides, Nunes et al. (1994) isolaram uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol acético (IAA), que ativa o metabolismo dos espermatozoides. A introdução do IAA na composição dos diluentes convencionais do sêmen de diferentes espécies conferiu aos espermatozoides um aumento de motilidade, maior taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais prolongados. A presença do IAA pode variar com o estágio de maturação e a espécie do fruto e influir nos resultados *in vitro* e *in vivo* em sêmen diluído em água de coco (NUNES e SALGUEIRO, 1999).

Nunes et al. (1996) compararam a fertilidade de cabras inseminadas com sêmen diluído em água de coco *in natura* ou na fração ativa da água de coco (fração B) ou em IAA (molécula ativa da água de coco) e observaram taxas de parição de 60%, 65% e 69% para os três tratamentos, resultando em prolificidade de 130%, 145% e 180%, respectivamente.

A água de coco tem sido utilizada em biotecnologias da reprodução animal, obtendo-se bons resultados com a utilização na preservação do sêmen de animais domésticos como caprinos (RODRIGUES et al., 1994; NUNES, 1998; CAMPOS et al., 2003), ovinos (ARAÚJO, 1990; FIGUERÊDO et al., 2001), suínos (TONIOLLI e MESQUITA, 1990), peixes (CARVALHO et al., 2002; VIVEIROS et al., 2007), humanos (FAUSTINO, 2007), equinos (SOBREIRA NETO, 2008) e cães (MONTEZUMA JR. et al., 1994; CARDOSO et al., 2006).

Diluentes de sêmen à base de água de coco apresentam como vantagens o baixo custo, fácil preparo, além do fato do coco ser abundante no Nordeste do Brasil. Entretanto, a água de coco apresenta dificuldades quanto à conservação por longos períodos após extração do fruto, limitações na sua disponibilidade em regiões onde há a carência do vegetal, além de variações na constituição bioquímica da água de coco entre diferentes frutos. Isto motivou o desenvolvimento do produto água de coco em

pó (ACP) (Fig. 2), onde os constituintes nutricionais da água de coco são obtidos em sistema de desidratação a alto vácuo. O produto ACP se caracteriza por possuir composição padronizada (Quadro 1), obtido a partir de frutos oriundos de plantações orgânicas certificadas, além de possuir características bioquímicas similares às da água de coco *in natura*. Para a conservação do sêmen caprino, a formulação ACP-101c foi desenvolvida.



Figura 2. Água de coco em pó (ACP).

Quadro 1. Composição da água de coco em pó (ACP), estabelecidos mediante análises em laboratórios de referência certificados pela ANVISA e INMETRO (dados fornecidos pela empresa ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará), 2010.

Por 100g	
Carboidrato, por diferença (g)	76,00
Frutose (g)	7,80
Glicose (g)	6,20
Sacarose (g)	0,00
Proteína (g)	12,00
Umidade (g)	1,00
LIPÍDIOS - Por 100g	
Gorduras totais (g)	4,00
Gorduras saturadas (g)	2,46
8:0 ácido caprílico (g)	0,02
10:0 ácido cáprico (g)	0,02
12:0 ácido láurico (g)	1,41
14:0 ácido mirístico (g)	0,60
16:0 ácido palmítico (g)	0,42
<i>Gorduras monoinsaturadas (g)</i>	
18:1 ácido oleico (g)	0,12
<i>Gorduras polinsaturadas (g)</i>	<i>0,47</i>
18:2 ácido linoleico (g)	0,54
Gorduras trans (g)	0,00
Colesterol (mg)	0,00
MINERAIS - Por 100g	
Sódio, Na (mg)	2.240,00
Cálcio, Ca (mg)	492,00
Ferro, Fe (mg)	8,00
Cobre, Cu (mg)	0,38
Fósforo, P (mg)	430,00
Magnésio, Mg (mg)	510,00
Manganês, Mn (mg)	2,60
Potássio, K (mg)	5.170,00
Selênio, Se (mg)	0,03
Zinco, Zn (mg)	3,30
VITAMINAS - Por 100g	
Vitamina B1 (mg), tiamina	4,55
Vitamina B2 (mg), riboflavina	0,07
Vitamina B3 (mg), niacina (ácido nicotínico e vitamina PP)	3,56
Vitamina B6 (mg), piridoxina	0,13
Vitamina C (mg), ácido ascórbico	16,51

AMINOÁCIDOS - Por 100g	
Ácido Aspártico (mg)	4,73
Ácido Glutâmico (mg)	12,41
Alanina (mg)	7,63
Arginina (mg)	1,88
Cistina (mg)	traços
Fenilalanina (mg)	4,93
Glicina (mg)	3,98
Histidina (mg)	2,36
Isoleucina (mg)	2,65
Leucina (mg)	5,15
Lisina (mg)	2,61
Metionina (mg)	1,58
Prolina (mg)	5,34
Serina (mg)	2,54
Tirosina (mg)	0,82
Treonina (mg)	1,84
Triptofano (mg)	traços
Valina (mg)	5,23
Ômega 3 (g)	0,02
Ômega 6 (g)	0,02

3 JUSTIFICATIVA

O interesse pelo uso da água de coco em pó como diluente seminal vem crescendo, confirmando sua eficiência quando comparado aos diluentes tradicionais, permitindo a disponibilidade do produto em centros de pesquisa que não utilizem esse diluente como padrão ou que não disponham da matéria prima (coco), e que visem sua utilização em programas de criopreservação de espermatozoides.

Tendo em vista que o rebanho caprino nordestino é composto, em sua maioria, por animais sem padrão racial definido e de baixa produtividade, a inseminação artificial de cabras com sêmen criopreservado de reprodutores selecionados usando diluentes à base de água de coco em pó otimizará o melhoramento genético, aumentando a produtividade do plantel caprino nordestino.

Apesar de trabalhos demonstrarem que a água de coco pode exercer ação benéfica sobre a conservação celular, há ainda a necessidade da realização de estudos que comparem o efeito da criopreservação do sêmen caprino com os mais diversos parâmetros seminais com o uso deste diluente.

Considerando o fato de que a morfologia normal dos espermatozoides tem relação com o potencial de fertilização de um reprodutor, e tendo a criopreservação e o tipo de diluente interferência sobre as dimensões e formato dos espermatozoides, é de fundamental importância conhecer os efeitos do uso do diluente ACP-101c sobre a morfometria e morfologia dos espermatozoides caprinos criopreservados.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) mostra-se capaz de criopreservar o sêmen caprino, apresentando parâmetros morfológicos e morfométricos semelhantes ao meio à base de TRIS, tornando-se mais uma alternativa mercadológica para a área de reprodução animal, uma vez que este apresenta relação custo/benefício equiparável aos diluentes tradicionais.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da criopreservação e do tipo de diluente sobre os parâmetros morfométricos e morfológicos da cabeça de espermatozoides de caprinos nos meios diluentes ACP-101c e TRIS.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da criopreservação sobre a viabilidade e a morfologia dos espermatozoides caprinos frescos diluídos e criopreservados em ACP-101c ou TRIS, quanto às alterações de cabeça, peça intermediária e flagelo;
- Avaliar o efeito da criopreservação sobre os parâmetros morfométricos relacionados à dimensão da cabeça de espermatozoides (comprimento, largura, área e perímetro) no sêmen fresco diluído e criopreservados de caprinos nos diluentes ACP-101c e TRIS, utilizando a análise seminal auxiliada por computador (CASA);
- Avaliar o efeito da criopreservação sobre os parâmetros morfométricos de formato da cabeça de espermatozoides (elipicidade, alongação, rugosidade e regularidade) no sêmen fresco diluído e criopreservados de caprinos nos diluentes ACP-101c e TRIS, utilizando a análise seminal auxiliada por computador (CASA).

6 CAPÍTULO 1

Efeitos da criopreservação sobre a morfologia e morfometria de espermatozoides de caprinos diluídos em meio à base da água de coco em pó (ACP-101c)

[Cryopreservation effects on head morphology and morphometry of goat spermatozoa extended on media based on powder coconut water (PCW-101c)]

Periódico: Archivos de Zootecnia (submetido em março de 2011).

Efeitos da criopreservação sobre a morfologia e morfometria de espermatozoides de caprinos diluídos em meio à base da água de coco em pó (ACP-101c)

[Cryopreservation effects on morphology and morphometry of goat spermatozoa extended on media based on powder coconut water (PCW-101c)]

Aragão, C.P.M.^{1*}, S.P. Maia¹, J.M.M. Cavalcante¹, G.V. Aguiar¹, C.C. Campello²,
C.S.B. Salmito-Vanderley¹, J.F. Nunes¹

¹Programa Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Veterinária. Núcleo Integrado de Biotecnologia. Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino. Universidade Estadual do Ceará. Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Programa Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Veterinária. Laboratório de Manipulação de Folículo Ovarianos Pré-Antrais. Universidade Estadual do Ceará. Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brasil.

*Experimento integrante da dissertação de Mestrado do primeiro autor. E-mail: carlavet1@hotmail.com

RESUMO

A morfologia normal dos espermatozoides pode ser um indicador do potencial de fertilização dos mesmos, entretanto a criopreservação pode alterar as dimensões dos espermatozoides na espécie caprina. O objetivo do trabalho foi avaliar os diluentes ACP-101c e TRIS quanto aos parâmetros morfológicos e morfométricos do sêmen caprino fresco diluído e criopreservado, utilizando a análise de sêmen auxiliada por computador (CASA). Foram utilizados quatro caprinos e as colheitas de sêmen foram realizadas com uso de vagina artificial, duas vezes por semana, totalizando 28 ejaculados válidos. Em cada coleta o sêmen obtido dos quatro caprinos foram reunidos em um pool, divididos em duas alíquotas, diluídos em ACP-101c e TRIS e criopreservados. Foram realizados esfregaços tanto para o sêmen fresco diluído, como para o descongelado em ACP-101c e TRIS, em seguida corados com eosina-nigrosina para análise morfológica e viabilidade, e com kit Panótico CBC (Instant-Prov) para análise morfométrica no módulo de morfometria do sistema CASA. Avaliou-se 100 espermatozoides corretamente digitalizados por lâmina para os parâmetros de tamanho (comprimento, largura, área e perímetro da cabeça) e parâmetros de forma (elipicidade, alongação, rugosidade, regularidade). Não foram encontradas diferenças estatísticas no percentual de células viáveis entre o sêmen fresco diluído e o descongelado nos diluentes ACP-101c e TRIS, entretanto o sêmen criopreservado em ACP-101c mostrou resultados significativamente superiores ao diluente TRIS ($p < 0,05$). Em relação à morfologia, o diluente TRIS apresentou valores superiores quanto aos defeitos de peça intermediária. Os parâmetros morfométricos relacionados à dimensão do espermatozoide do sêmen fresco diluído foram superiores ao sêmen descongelado quanto ao comprimento, área e perímetro no diluente ACP-101c e largura no diluente TRIS. Em relação aos parâmetros de forma do espermatozoide, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os diluentes ACP-101c e TRIS, exceto na regularidade que foi inferior no sêmen descongelado, para ambos os diluentes. O diluente ACP-101c apresentou-se superior ao TRIS na conservação da morfologia espermática na análise subjetiva, entretanto a criopreservação afetou alguns dos parâmetros morfométricos de dimensão no diluente ACP-101c. Conclui-se que o diluente ACP-101c apresenta-se favorável à conservação de espermatozoides frescos e criopreservados de caprinos.

Palavras-chave: Caprino. Sêmen. Água de coco em pó. CASA.

SUMMARY

Normal morphology of spermatozoa may serve as an indicator of their fertilizing potential, but cryopreservation may alter the dimensions of goat spermatozoa. This study aimed at evaluating the extenders PCW-101c and TRIS, considering morphologic and morphometric parameters of fresh diluted and cryopreserved goat semen, through Computer-Assisted Semen Analysis (CASA). Four

bucks were assessed and semen collections were performed twice a week, by using an artificial vagina, obtaining a total of 28 valid ejaculates. For each collection, semen obtained from four bucks were mixed in a pool, divided into two aliquots, diluted with PCW-101c and TRIS and cryopreserved. Smears of diluted fresh and thawed semen diluted with PCW-101c and TRIS were made and stained with eosin-nigrosine to analyze sperm morphology and viability, and stained with panoptic to analyze sperm morphometry through CASA system. One hundred correctly digitalized spermatozoa per smear were evaluated, considering size (length, width, area and head perimeter) and shape (ellipticity, elongation, rugosity and regularity). No statistical differences were observed in the percentage of viable cells between diluted fresh and cryopreserved semen, with PCW-101c presenting significantly superior results, when compared to TRIS ($p < 0,05$). Concerning morphology, TRIS presented superior values, considering intermediate piece defects. Morphometric values related to the size of the sperm from fresh diluted semen were superior to thawed semen, concerning length, area and perimeter when using PCW-101c, and width, when using TRIS. Concerning sperm shape, no statistical differences were observed between the extenders PCW-101c and TRIS, except for sperm regularity, which was inferior for thawed semen, using both extenders. PCW-101c showed to be superior to TRIS for the conservation of spermatid morphology, considering the subjective analysis. However, cryopreservation affected some of the morphometric parameters of size, even when using the extender PCW-101c. It can be concluded that the extender PCW-101c contributes to the conservation of fresh and cryopreserved goat spermatozoa.

Keywords: Goat. Semen. Powder coconut water. CASA.

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen tem permitido a preservação indefinida de gametas de animais de alto valor genético (Hidalgo *et al.*, 2007). Entretanto, esta técnica produz efeitos deletérios na atividade espermática e fertilidade (Watson, 2000). A análise seminal permite determinar o potencial de fertilização de uma amostra de sêmen (O'Meara *et al.*, 2008). Comumente são avaliadas motilidade espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal e morfologia, uma vez que a criopreservação leva a uma redução destes parâmetros. Particularmente quanto à morfologia, tem sido demonstrado que a redução do percentual de espermatozoides morfológicamente normais resulta num decréscimo na fertilidade (Colas, 1981).

Entretanto, a avaliação morfológica tem sido realizada subjetivamente, resultando em variação de resultados entre técnicos e laboratórios. Isto motivou o desenvolvimento de sistemas automatizados de análise morfométrica do sêmen (CASMA) (Verstegen *et al.*, 2002), permitindo uma avaliação objetiva e acurada de diferenças sutis nas dimensões da cabeça do espermatozoide (Gravance *et al.*, 1998a).

Estudos utilizando CASMA têm demonstrado que a criopreservação reduz as dimensões dos espermatozoides nas mais diversas espécies (Gravance *et al.*, 1998b; Arruda *et al.*, 2002; Marco-Jiménez *et al.*, 2006; García-Herreros *et al.*, 2007; Hidalgo *et al.*, 2007; Rubio-Guillén *et al.*, 2007). A criopreservação afeta várias estruturas celulares, como mitocôndrias (Windsor & White, 1995), acrossoma (Valcarcel *et al.*, 1997) e DNA espermático (Peris *et al.*, 2004) e as diferenças morfométricas encontradas no sêmen criopreservado têm sido atribuídas a estas alterações (Gravance *et al.*, 1998b; Arruda *et al.*, 2002).

Os parâmetros morfométricos também são influenciados pelo tipo de diluente (Hidalgo *et al.*, 2007). O diluente TRIS-frutose-gema é o mais comumente utilizado na criopreservação do sêmen caprino (Evans & Maxwell, 1990). No intuito de facilitar a disponibilidade de diluentes seminais e reduzir seus custos, novos meios têm sido pesquisados. Nunes (1988) desenvolveu um diluente de origem vegetal à base de água de coco que tem se mostrado efetivo na conservação do sêmen de caprinos (Nunes, 1988; Campos *et al.*, 2003), ovinos (Figueirêdo *et al.*, 2001), suínos (Tonioli *et al.*, 1998), peixes (Carvalho *et al.*, 2002) e cães (Cardoso *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2006). Para possibilitar sua disponibilidade em regiões desprovidas do fruto (coco), permitir sua maior durabilidade e padronização da constituição bioquímica, foi desenvolvido o produto água de coco em pó (ACP) obtido a partir da desidratação da água de coco em alto vácuo, que tem sido testado e comprovado na conservação do sêmen de diferentes espécies animais como ovinos (Salgueiro *et al.*,

2004; Machado *et al.*, 2006), cães (Cardoso *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2007), gatos (Silva *et al.*, 2007) e peixes (Vieira *et al.*, 2007).

Poucos são os trabalhos de avaliação morfométrica do espermatozoide da espécie caprina. Os estudos sobre os efeitos do diluente ACP-101c sobre os parâmetros morfológicos são escassos e não existem resultados publicados referentes à ação deste diluente sobre a morfometria de espermatozoides diluídos e criopreservados no sêmen de caprinos. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da criopreservação sobre a morfologia e morfometria de espermatozoides de caprinos diluídos em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) e TRIS.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), inserido no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará. O Núcleo está localizado na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil, com latitude de 3°43'47" sul, longitude de 38°30'37" oeste e altitude de 16 metros acima do nível do mar (IBGE/IPECE, 2009). O clima da região, de acordo com a classificação de Koppen, é AW, quente e úmido, com médias térmicas variando entre 26 a 27 °C, máximas de 30 °C e mínimas de 19 °C.

O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) com número de protocolo 09230330-7.

Foram coletados 28 ejaculados de quatro reprodutores caprinos de três raças distintas, dois Saanen, um Boer e um Murciano-Granadina, com fertilidade comprovada e idade variando de dois a quatro anos, mantidos em baias individuais pertencentes ao LTSCO/NIB/UECE. Os animais foram alimentados com feno de tifton (*Cynodon* sp.) e concentrado comercial com 18% PB, além de sal mineral e água à vontade.

As coletas de sêmen foram realizadas com uso de vagina artificial, duas vezes por semana, sendo sete coletas por animal, totalizando 28 ejaculados. Após a coleta, foi formado um *pool* dos ejaculados que foi mantido em banho Maria a 37 °C para avaliação do volume (medido em tubo graduado), concentração (câmara de Neubauer), motilidade massal, percentual de espermatozoides móveis e vigor, segundo metodologia de Chemineau *et al.* (1991). Foram utilizados apenas ejaculados com volume superior a 0,5 mL, concentração mínima de espermatozoides de $3,5 \times 10^9$ spz/mL, motilidade massal e vigor mínimo de 3,0 e percentual de espermatozoides móveis superior a 80% (CBRA, 1998).

Foram utilizados os diluentes ACP-101c (pH 7,1; 369 mOsm/Kg H₂O) e TRIS (pH 6,8; 302 mOsm/Kg H₂O) para a criopreservação. Ambos diluentes foram divididos em duas frações (fração "A" e "B"). A fração "A" do diluente ACP-101c (ACP Biotecnologia, Fortaleza-Ceará, Brasil), foi preparada segundo recomendação do fabricante, com acréscimo de 40 mg de gentamicina e 5% de gema de ovo, enquanto a fração "A" do diluente TRIS consistiu de 3,786 g de Tris, 2,11 g de ácido cítrico, 1,0 g de frutose, 40 mg de gentamicina, 20% de gema de ovo em 100 mL de água destilada (Singh *et al.*, 1995). A fração "B" de cada diluente tinha a mesma constituição da fração "A", mas acrescida de 14% de glicerol, de modo a obter, após sua diluição, concentração final de 7% de glicerol.

Após a mensuração da concentração espermática de cada *pool*, foi calculada a quantidade das frações "A" e "B" de cada diluente. As amostras de sêmen foram divididas em duas alíquotas e diluídas nas frações "A" de ACP-101c e TRIS. Estas diluições foram realizadas a 37 °C de modo a obter uma concentração de 800×10^6 spz/mL. Em seguida o sêmen diluído foi resfriado até 4 °C em 45 minutos quando então foi realizada a adição, em três etapas (Chemineau *et al.*, 1991) da fração "B", a cada cinco minutos, de cada diluente, obtendo concentração final de 400×10^6 spz/mL. O sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,25 mL (com 100×10^6 espermatozoides cada), previamente identificadas.

Após o envase, as palhetas foram colocadas em suportes próprios e congeladas em vapores de nitrogênio líquido a 3,5 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 10 minutos (-70 °C), em seguida imersas em nitrogênio líquido, acondicionadas em *racks* e estocadas em botijões criogênicos a -196 °C.

Para a avaliação espermática foram utilizados tanto o sêmen fresco diluído como o descongelado.

Para o sêmen congelado, uma palheta de cada diluente, por animal e coleta foi descongelada por imersão da mesma em banho Maria por 30 segundos a 37 °C e, seu conteúdo, alocados em tubos modelo Eppendorf mantidos em banho Maria a mesma temperatura.

Tanto o sêmen fresco diluído como o sêmen descongelado foram avaliados para os parâmetros viabilidade, morfologia e morfometria espermática. A avaliação das alterações morfológicas e da viabilidade espermática foram realizadas através de esfregaços de sêmen (10 µL) em lâmina corada com eosina-nigrosina. Em cada esfregaço foram avaliados 200 espermatozoides, escolhidos aleatoriamente por toda a lâmina, que foram separadamente analisados quanto à viabilidade espermática, onde o total dos espermatozoides não corados (membrana íntegra) e corados (lesão de membrana) foi quantificado e, quanto às alterações morfológicas, onde o percentual de espermatozoides com alterações de cabeça, peça intermediária e flagelo e as gotas citoplasmáticas proximais e distais, além do percentual de espermatozoides morfológicamente normais também foi determinado (Colas, 1980).

As análises morfométricas foram realizadas tanto com o sêmen fresco diluído como criopreservado em ACP-101c e TRIS. Cinco microlitros de sêmen fresco diluído ou criopreservado foram diluídos/re-diluídos em solução de cloreto de sódio 0,9% e incubados por cinco minutos a 37 °C, a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. Cinco microlitros desta suspensão foram utilizados para confecção de esfregaços em lâminas para microscopia e secas ao ar. Estas lâminas foram coradas segundo método de Hidalgo *et al.* (2006) adaptado, utilizando o kit Panótico CBC (Instant-Prov). Um mínimo de 100 cabeças de espermatozoides corretamente digitalizadas foram analisadas utilizando o módulo morfológico do sistema de análise do sêmen auxiliado por computador (SCA, versão 3.2., Microoptics S.L., Barcelona, Espanha). O equipamento consiste de microscópio equipado com objetiva de 40x, acoplada a uma câmera digital, para captura de imagens e transmissão a um computador onde está instalado o software. Os espermatozoides são capturados aleatoriamente em diferentes campos. As células digitalizadas tiveram suas bordas automaticamente definidas. Espermatozoides com erro na digitalização destas bordas foram descartados manualmente em posterior avaliação. O módulo de morfometria calculou automaticamente os parâmetros morfométricos dos espermatozoides analisados (Fig.1).

Foram utilizados os seguintes parâmetros morfométricos: comprimento (C, µm), largura (L, µm), perímetro (P, µm) e área (A, µm²) e as razões: elipicidade (C / L), alongação (C-L / C+L), rugosidade ($4\pi A/P^2$) e regularidade ($\pi LW/4A$). Os parâmetros para cada espermatozoide analisado foram salvos em planilha Excel® (Microsoft Corporation, EUA).

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificação da normalidade da distribuição e homocedasticidade, respectivamente. Confirmadas as exigências para realização da análise de variância, esta foi executada por meio do PROC GLM (SAS, 2002) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. As variáveis defeitos de cabeça e flagelo, percentagem de espermatozoides vivos e mortos não apresentaram homogeneidade de variâncias entre os tratamentos e foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A criopreservação afetou significativamente o percentual de células viáveis, observada pelo método de coloração por eosina-nigrosina, com redução no percentual de células viáveis no sêmen criopreservado, independente do diluente utilizado, não sendo encontradas diferenças estatísticas entre ACP-101c e TRIS (Tab. I).

Não foram encontradas diferenças estatísticas no percentual de células normais entre o sêmen fresco diluído e o descongelado nos diluentes ACP-101c e TRIS. O sêmen criopreservado com ACP-101c apresentou resultados significativamente superiores ao diluente TRIS. A criopreservação e o tipo de diluente não afetaram os defeitos de cabeça e flagelo. Não houve diferença significativa no efeito da criopreservação quanto aos defeitos de peça intermediária no diluente ACP-101c, porém este efeito foi observado no diluente TRIS, sendo este estatisticamente superior ao ACP-101c (Tab. II).

Os resultados dos parâmetros relacionados à dimensão dos espermatozoides estão apresentados na Tabela III. O sêmen fresco diluído mostrou-se estatisticamente superior ao sêmen descongelado nos parâmetros comprimento, área e perímetro no diluente ACP-101c e largura no diluente TRIS. O sêmen

fresco diluído em ACP-101c também apresentou valores superiores nos parâmetros comprimento, área e perímetro em relação ao sêmen fresco diluído em TRIS.

Os resultados dos parâmetros relacionados ao formato do espermatozoide no sêmen fresco e criopreservados de caprinos estão mostrados na Tabela IV. Não foram encontrados efeitos da criopreservação ou do diluente na elipicidade, alongação e rugosidade. Com relação à regularidade, este foi inferior no sêmen descongelado, independente do diluente utilizado.

Antes do experimento, todos os animais foram submetidos a avaliações clínicas, suplementação vitamínica, rotinas de coletas de sêmen e adaptação ao novo manejo.

Todas as amostras de sêmen usadas no experimento tiveram seus valores de motilidade massal aceitável pelo CBRA (1998). Entretanto, a análise da motilidade massal no início do experimento variou entre 3 e 3,5, o que pode ter contribuído para o aumento da quantidade de espermatozoides inviáveis no sêmen fresco diluído, pela técnica da eosina-nigrosina (20,29% para o diluente ACP-101c e 22,43% para o diluente TRIS). Esta porcentagem de espermatozoides mortos (corados) pela eosina-nigrosina foi superior aos achados de Gubartallah *et al.* (2005), Barkawi *et al.* (2006) e Nur *et al.* (2005), que encontraram valores de 9,2%, 12,7% e 15,49%, respectivamente, e semelhantes aos 22% observados por Zamiri & Heidari (2006).

Houve efeito da criopreservação em relação à viabilidade espermática com decréscimo significativo do número de espermatozoides viáveis no sêmen descongelado (8,29% e 17,28 %, para ACP-101c e TRIS, respectivamente).

É conhecida a ação da criopreservação em induzir crioinjúrias físicas às células (Holt & Van Look, 2004), o que justifica esta redução dos espermatozoides viáveis no sêmen criopreservado. No processo de preservação de sêmen, especialmente o congelado, há ocorrência de danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozoides que, reduzem a motilidade e a viabilidade, impedindo o trânsito espermático no trato reprodutivo feminino e, conseqüentemente, prejudicando a fertilidade (Leboeuf *et al.*, 2000). Estes danos são atribuídos à ruptura da membrana espermática, causada pela formação de cristais de gelo intracelular, que ocorre durante o processo de congelação e descongelação (Mazur, 1984).

As semelhanças dos resultados obtidos com os diluentes TRIS e ACP-101c para o método de coloração utilizado é indicativo da equivalência destes diluentes na preservação da viabilidade espermática.

O percentual de espermatozoides normais no sêmen fresco diluído com ACP-101c e TRIS foi respectivamente, 81,86% e 84,64%. Estes valores são inferiores aos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) que é de 85%; entretanto, não diferiram estatisticamente para os valores encontrados para a porcentagem de espermatozoides normais no sêmen descongelado que foram de 84,56% para ACP-101c e 73,86% para o TRIS, sendo o ACP-101c superior ao TRIS no sêmen descongelado. Estes resultados foram superiores àqueles encontrados por Oliveira *et al.* (2009) (64,54% para ACP-101 e 61,79% para TRIS). A qualidade espermática inicial também pode ter influenciado no percentual de células normais.

Um maior número de alterações de peça intermediária tanto no sêmen fresco diluído como no descongelado em ACP-101c ou TRIS foi observado, contradizendo os achados de Oliveira *et al.* (2009) que encontraram um maior número de defeitos de cabeça no sêmen criopreservado utilizando os mesmos diluentes.

Assim, como não foi observado efeito da criopreservação nas patologias de cabeça e flagelo, sendo apenas observada diferença estatística no diluente TRIS nas alterações de peça intermediária, pode-se afirmar que as alterações encontradas sejam decorrentes da má qualidade espermática inicial, e não do efeito diluente.

Foi realizada a análise morfométrica de um mínimo de 100 cabeças de espermatozoides corretamente digitalizadas uma vez que Hidalgo *et al.* (2006) concluíram que não há diferença estatística na análise morfométrica de 100, 150, 175 ou 200 cabeças de espermatozoides, o que é interessante pois esta análise é bastante laboriosa e exige bastante tempo do analisador.

Todos os parâmetros de tamanho dos espermatozoides no sêmen fresco diluído em ACP-101c ou TRIS, encontraram-se maiores àqueles encontrados por Gravance *et al.* (1997), e menores do que os valores encontrados por Hidalgo *et al.* (2007), sendo que os espermatozoides diluídos em ACP-101c apresentaram também dimensões superiores ao TRIS, exceto na largura.

Este efeito do aumento da célula espermática no diluente ACP-101c foi observado com o sêmen criopreservado de Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), onde as dimensões dos espermatozoides criopreservados em ACP-104 foram superiores ao sêmen criopreservado no diluente Ringer e ao sêmen fresco não diluído (controle) (Melo *et al.*, 2010).

Neste trabalho, a criopreservação diminuiu as dimensões dos espermatozoides nos parâmetros comprimento, área e perímetro no diluente ACP-101c e largura no diluente TRIS, porém não houve diferença significativa entre os dois diluentes. Também não foram encontrados efeitos da criopreservação ou do diluente na elipicidade, alongação e rugosidade. A regularidade foi inferior no sêmen descongelado, também não apresentando diferença estatística entre o ACP-101c e TRIS.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas para os parâmetros largura no diluente ACP-101c e comprimento, área e perímetro no diluente TRIS, observa-se que em valores absolutos todas as amostras de sêmen fresco diluído foram superiores em relação ao descongelado, e possivelmente não foram encontradas diferenças estatísticas pelo número de amostras trabalhadas neste experimento.

Estes resultados mostram que tanto o sêmen criopreservado em ACP-101c como em TRIS apresenta o mesmo potencial de conservação espermática, estando os valores encontrados para os parâmetros morfométricos em acordo com a literatura.

Em caprinos, Gravance *et al.* (1997) não observaram efeitos da criopreservação na morfometria dos espermatozoides, exceto em alguns animais, o que poderia ser devido ao protocolo de congelamento ou à presença de diferentes populações de espermatozoides presentes em alguns animais ou ejaculados que favorecem o sucesso no processo de congelamento (Hidalgo *et al.*, 2007).

Além disso, Gravance *et al.* (1997) utilizaram como coloração a hematoxilina e Hidalgo *et al.* (2007) utilizaram o Diff Quik, este último é semelhante ao utilizado neste trabalho. É possível também que a técnica de coloração também tenha alguma interferência nos resultados da morfometria.

A avaliação dos parâmetros morfométricos tem relevância fundamental para determinação e distribuição de espermatozoides viáveis que podem definir um grau de fertilidade *in vitro* e *in vivo* de acordo com as alterações encontradas na constituição das células espermáticas.

As diferenças encontradas na literatura reforçam a idéia de que a morfometria espermática é afetada por inúmeros fatores dentre eles, o protocolo de congelamento, os diferentes diluentes e a técnica de coloração, além da variação individual de cada reprodutor que, neste experimento, tentou-se eliminar com a avaliação do *pool* e não dos ejaculados individuais.

CONCLUSÃO

Os parâmetros morfológicos e morfométricos do sêmen caprino trabalhados em diluentes de origem vegetal ricos em carboidratos e minerais, como a água de coco, podem apresentar relações de interação com os metabólitos do diluente utilizado que podem interferir na permeabilidade da membrana plasmática incrementando as dimensões das partes vitais dos espermatozoides, comprometendo ou beneficiando a morfofisiologia de espermatozoides caprinos avaliados *in vitro*.

Estudos complementares da avaliação *in vivo* desses diluentes poderão esclarecer o benefício dessas alterações em programas de inseminação artificial, uma vez que o diluente ACP-101c foi capaz de conservar a viabilidade do sêmen assim como teve seus parâmetros morfométricos pós-descongelamento semelhantes aos encontrados no diluente TRIS.

AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo Integrado em Biotecnologia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará; a empresa ACP Biotecnologia pela cessão do diluente ACP-101c.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arruda, R.P., B.A. Ball, C.G. Gravance, A.R. Garcia and I.K.M. Liu. 2002. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion head morphometry. *Theriogenology*, 58: 253-256.

- Barkawi, A.H., E.H. Elsayed, G. Ashour and E. Shehata. 2006. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Rumin. Res.*, 66: 209-213.
- Campos, A.C.N., J.F. Nunes, A.W.U. Monteiro, J.H.T. Pinheiro, M.A.L. Ferreira, A.A. Araújo and J.F. Cruz. 2003. Conservação do sêmen caprino a 4 °C durante o período seco e chuvoso no Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 27: 620-624.
- Cardoso, R.C.S., A.R. Silva, D.C. Uchoa and L.D.M. Silva. 2003. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology* 59: 743-751.
- Cardoso, R.C.S., A.R. Silva and L.D.M. Silva. 2005. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Anim. Reprod.*, 2: 257-262.
- Cardoso, R.C.S., A.R. Silva and L.D.M. Silva. 2006. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender *Anim. Reprod. Sci.*, 92: 384-391.
- Cardoso, R.C.S., A.R. Silva, L.D.M. Silva, V.H. Chirine, F.F. Souza and M.D. Lopes. 2007. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. *Reprod. Dom. Anim.*, 42: 11-16.
- Carvalho, M.A.M., J.F. Nunes and J.M. Gondim. 2002. Prolongamento da motilidade de espermatozoides de carpa comum, *Cyprinus carpio* L., pelo uso de água de coco (*Cocos nucifera*) como diluidor de sêmen. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 5: 184-186.
- CBRA. 1998. *Manual para Exame e Avaliação de Sêmen Animal*. 2. ed. 79p. CBRA, Belo Horizonte.
- Chemineau, P., Y. Cagnie, Y. Guérin, P. Orgeur and J.C. Vallet. 1991. *Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats*. 222p. FAO Reproduction and Health Paper. Rome.
- Colas, G. 1980. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France. I. Étude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Dev.* 20: 1789-1799.
- Colas, G. 1981. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Île-de-France. II. Fécondance: relation avec les critères qualitatifs observés in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 21: 399-407.
- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1990. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. 192p. Editora Acribia, Zaragoza.
- Figueirêdo, E.L., A.W.U. Monteiro, A.H.S. Silva Filho, A.C.N. Campos and J.F. Nunes. 2001. Avaliação *in vitro* do sêmen ovino resfriado diluído em água de coco previamente criopreservado em nitrogênio líquido. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 25: 430-431.
- Garcia-Herrerros, M., F.J. Barón, I.M. Aparício, A.J. Santos, L.J. García-Marín and M.C. Gil. 2007. Morphometric changes in boar spermatozoa induced by cryopreservation. *International J. Androl.*, 31: 490-498.
- Gravance, C.G., C. White, K.R. Robertson, Z.J. Champion and P.J. Casey. 1997. The effects of cryopreservation on morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Anim. Reprod. Sci.*, 49: 37-43.
- Gravance, C.G., Z.J. Champion and P.J. Casey. 1998a. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, 49: 1219-1230.
- Gravance, C.G., R. Vishwanath, C. Pitt, D.L. Garner and P.J. Casey. 1998b. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J. Androl.* 19: 704-709.
- Gubartallah, K.A., A.A. Amel, O. Bakhiet, A. Babiker. 2004. Comparative studies on reproductive performance of Nubian and Saanen Bucks under the climatic conditions of Khartoun. *J. Anim. Vet. Adv.*, Faisalab, 4:133-139.
- Hafez, E.S.E and B. Hafez. 2004. *Reprodução Animal*. 7 ed. 513p. Manole, São Paulo.
- Hidalgo, M., I. Rodriguez and J.M. Dorado. 2006. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology*, 66: 996-1003.
- Hidalgo, M., I. Rodríguez and J.M. Dorado. 2007. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat to sperm freezability. *Anim. Reprod. Sci.*, 100: 61-72.
- Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Ani. Reprod. Sci.*, 62: 3-22.
- IBGE/IPECE, Perfil Básico Municipal, 2009. Governo do Estado do Ceará. Disponível em <<http://www.ipece.ce.gov.br/>>, data de acesso: 25/02/2011.

- Lebouf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 113-141.
- Machado, V.P., J.F. Nunes, A.A. Araújo, D.R.P. Fernandez, M.A. Cordeiro, C.H.N. Medeiros, A.L.N. Medeiros and A.W.U. Monteiro. 2006. Fertilidade após inseminação artificial intra-cervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 43: 43-49.
- Marco-Jiménez F., M.P. Viudes-de-Castro, S. Balasch, E. Mocé, M.A. Silvestre, E.A. Gomez and J.S. Vicente. 2006. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, 52: 295-304.
- Mazur, P. 2004. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, 247: 125-142.
- Melo, M.A.P. 2010. *Água de coco em pó (ACP-104) adicionada de crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozoides de pirapitinga (Piaractus brachypomus) pós-descongelamento*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza.
- Nunes, J.F. 1988. A inseminação artificial em caprinos no Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 12: 85-91.
- Nur, Z., I. Dogan, U. Gunay and M.K. Soylu. 2005. Relationship between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of Saanen goats. *Bull. Vet. Res. Inst. Pulawi.*, 49: 183-187.
- O'Meara, C.M.O., Hanrahan, J.P. Prathalingam, J.S. Owen, A. Donovan, S. Fair, M. Ward, A.C.O. Evans and P. Lonergan. 2008. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 69: 513-522.
- Oliveira, R.V., J.F. Nunes, C.C.M. Salgueiro, J.M.M. Cavalcante and A.A.A. Moura. 2009. 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. *Ciê. An. Bras.*, 10: 862-869.
- Peris S.I., A. Morrier, M. Dufour and J.L. Bailey. 2004. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J. Androl.*, 25: 224-33.
- Rubio-Guillén, J., J.J.G. López-Brea, M.C. Estesio, M.R. Fernández-Santos, D.M.G. Villalobos, R.P. Naveda, J.C. Velarde, N.A. Madrid-Bury, E. Soto-Belloso and A.A. Quintero-Moreno. 2007. Head dimensions of Brahman and their crossbred bull spermatozoa are affected by cryopreservation. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, 17: 508-513.
- Salgueiro, C.C.M., J.M. Gondim, J.F. Nunes, M.A. Cordeiro, J.M.M. Cavalcante, V.P. Machado and J.H.T. Pinheiro. 2004. Artificial insemination of sheep with semen extended on powder coconut water (ACP-102[®]), cooled and maintained at 4 °C for 48 hours. 2004. In: 15th International Congress of Animal Reproduction (ICAR), Porto Seguro. *Anais...* p. 374. Porto Seguro.
- SAS Institute, 2002. SAS procedures guide, version 9. SAS - Statistical Analysis System Institute, Cary.
- Silva T.F.P., C.L. Ackermann, F.T.S. Pinheiro and L.D.M. Silva. 2007. Uso da água de coco em pó (ACP-117[®]) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. 2007. In: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Curitiba. *Anais...* p.191. Curitiba.
- Singh, M. P., A.K. Sinha and B.K. Singh. 1995. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, 43: 1047-1053.
- Toniolli, R., D.S.M. Mesquita and S.G. Cavalcante. 1998. Avaliação *in vitro* do sêmen suíno diluído em BTS e na água de coco *in natura* e estabilizada. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 22: 198-201.
- Valcarcel A., M.A. Heras, L. Perez, D.F. Moses and H. Baldassarre. 1997. Assessment of the acrossosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim. Reprod. Sci.*, 45: p. 299-309.
- Verstegen, J, M. Iguer-Ouada and K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149-179.
- Vieira, M.J.A.F., M.A.M. Carvalho, C.S.B. Salmito-Vanderley, J.M. Romão, R.V. Oliveira, A.R Silva Neto, C.C.M. Salgueiro and J.F. Nunes. 2007. Fertilização de óvulos de Tambaqui, *Collossoma*

- macropomum* (Cuvier, 1818), com uso de solução à base de água de coco em pó (ACP-104). In: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte. *Anais...* p. 67. Belo Horizonte.
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60/61: 481-492.
- Windsor, D.P. and I.G. White. 1995. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim. Reprod. Sci.*, 40: 43-58.
- Zamiri, M.J. and A.H. Heidari. 2006. Reproductive characteristics of Raylini male goats of Kerman province in Iran. *Anim. Reprod. Sci.*, 96: 176-185.

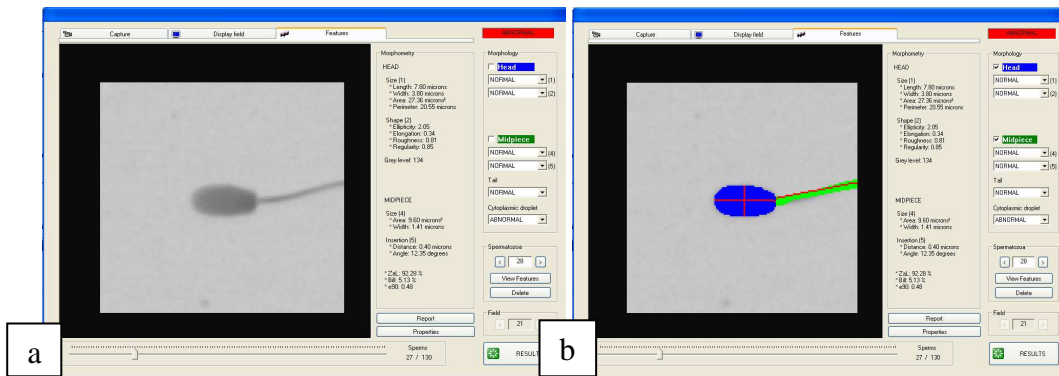


Figura 1. Análise morfométrica da cabeça de espermatozoide de caprino diluído em ACP-101c antes (a) e após (b) após a digitalização.

Tabela I. *Percentual de espermatozoides viáveis do sêmen caprino fresco diluído e criopreservado em ACP-101c e TRIS, corados com eosina-nigrosina. (Percentage of viable spermatozoa of fresh and cryopreserved goat semen in PCW-101c and TRIS, stained with eosin-nigrosine)*

Diluyente	Sêmen fresco diluído	Sêmen descongelado	CV(%)
ACP-101c	79.71 ± 8.01 ^{Aa}	8.29 ± 2.87 ^{Ba}	13.68
TRIS	77.57 ± 7.46 ^{Aa}	17.28 ± 12.30 ^{Ba}	21.44
CV(%)	9.84	69.84	

Letras maiúsculas diferentes entre colunas e minúsculas entre linhas (p<0,05).

Tabela II. Distribuição do percentual de espermatozoides normais e com alterações morfológicas do sêmen caprino fresco diluído e criopreservado em ACP-101c e TRIS. (Distribution of the percentage of spermatozoa normal and with morphologic changes of goat semen diluted and cryopreserved in PCW-101c and TRIS)

	Diluyente	Sêmen fresco diluído	Sêmen descongelado	CV(%)
Espermatozoides normais	ACP-101c	81.86 ± 7.25 ^{Aa}	84.56 ± 4.76 ^{Aa}	7.36
	TRIS	84.64 ± 10.41 ^{Aa}	73.86 ± 9.00 ^{Ab}	12.28
CV(%)		10.78	9.07	
Defeitos de cabeça	ACP-101c	0.28 ± 0.39 ^{Aa}	0.14 ± 0.38 ^{Aa}	180.02
	TRIS	0.07 ± 0.19 ^{Aa}	0.43 ± 0.93 ^{Aa}	269.04
CV(%)		172.82	248.96	
Defeitos de peça intermediária	ACP-101c	5.86 ± 5.95 ^{Aa}	5.43 ± 3.41 ^{Ab}	85.92
	TRIS	3.93 ± 5.55 ^{Ba}	9.43 ± 3.26 ^{Aa}	68.20
CV(%)		117.64	44.89	
Defeitos de flagelo	ACP-101c	11.64 ± 4.25 ^{Aa}	8.43 ± 2.19 ^{Aa}	33.68
	TRIS	10.79 ± 6.96 ^{Aa}	15.00 ± 7.03 ^{Aa}	54.27
CV(%)		51.40	44.47	

Letras maiúsculas diferentes entre colunas e minúsculas entre linhas ($p < 0,05$).

Tabela III. Distribuição do percentual das alterações morfológicas quanto aos parâmetros de dimensão do sêmen caprino fresco diluído e criopreservado em ACP-101c e TRIS, avaliados pelo CASA. (Distribution of the percentage of morphometric changes regarding the parameters of size of fresh goat sperm diluted and cryopreserved in PCW-101c and TRIS, assessed by CASA)

Parâmetro	Diluyente	Sêmen fresco diluído	Sêmen descongelado	CV(%)
Comprimento	ACP-101c	8.19 ± 0.20 ^{Aa}	7.79 ± 0.35 ^{Ba}	3.59
	TRIS	7.91 ± 0.23 ^{Ab}	7.67 ± 0.17 ^{Aa}	2.66
CV(%)		2.68	3.68	
Largura	ACP-101c	3.90 ± 0.11 ^{Aa}	3.76 ± 0.16 ^{Aa}	3.54
	TRIS	3.81 ± 0.10 ^{Aa}	3.65 ± 0.10 ^{Ba}	2.78
CV(%)		2.87	3.63	
Área	ACP-101c	27.67 ± 1.18 ^{Aa}	25.78 ± 1.92 ^{Ba}	5.98
	TRIS	26.12 ± 1.42 ^{Ab}	24.57 ± 1.30 ^{Aa}	5.39
CV(%)		4.87	6.62	
Perímetro	ACP-101c	21.12 ± 0.46 ^{Aa}	20.24 ± 0.84 ^{Ba}	3.27
	TRIS	20.43 ± 0.57 ^{Ab}	19.82 ± 0.51 ^{Aa}	2.69
CV(%)		2.49	3.52	

Letras maiúsculas diferentes entre colunas e minúsculas entre linhas ($p < 0,05$).

Tabela IV. Distribuição do percentual das alterações morfológicas quanto aos parâmetros de forma do sêmen caprino fresco diluído e criopreservado em ACP-101c e TRIS, avaliados pelo CASA. (Distribution of the percentage of morphometric changes regarding the parameters of shape of fresh goat sperm diluted and cryopreserved in PCW-101c and TRIS, assessed by CASA)

Parâmetro	Diluyente	Sêmen fresco diluído	Sêmen descongelado	CV(%)
Elipicidade	ACP-101c	2.10 ± 0.04 ^{Aa}	2.08 ± 0.06 ^{Aa}	2.33
	TRIS	2.08 ± 0.04 ^{Aa}	2.10 ± 0.03 ^{Aa}	1.71
CV(%)		1.93	2.30	
Elongação	ACP-101c	0.35 ± 0.01 ^{Aa}	0.35 ± 0.01 ^{Aa}	2.90
	TRIS	0.35 ± 0.01 ^{Aa}	0.35 ± 0.01 ^{Aa}	2.20
CV(%)		2.28	3.01	
Rugosidade	ACP-101c	0.78 ± 0.01 ^{Aa}	0.79 ± 0.01 ^{Aa}	1.33
	TRIS	0.79 ± 0.01 ^{Aa}	0.78 ± 0.01 ^{Aa}	0.78
CV(%)		0.95	1.35	
Regularidade	ACP-101c	0.91 ± 0.01 ^{Aa}	0.89 ± 0.01 ^{Ba}	1.03
	TRIS	0.91 ± 0.01 ^{Aa}	0.90 ± 0.01 ^{Ba}	0.57
CV(%)		1.02	0.88	

Letras maiúsculas diferentes entre colunas e minúsculas entre linhas ($p < 0,05$).

7 CONCLUSÕES

Os parâmetros morfológicos e morfométricos do sêmen caprino trabalhados em diluentes de origem vegetal ricos em carboidratos e minerais, como a água de coco, podem apresentar relações de interação com os metabólitos do diluente utilizado que podem interferir na permeabilidade da membrana plasmática incrementando as dimensões das partes vitais dos espermatozoides, comprometendo ou beneficiando a morfofisiologia de espermatozoides caprinos avaliados *in vitro*.

Os resultados apresentados mostram que tanto o sêmen criopreservado em ACP-101c como em TRIS apresenta o mesmo potencial de fertilização após a descongelação, estando os valores encontrados em acordo com a literatura.

Estudos complementares da avaliação *in vivo* desses diluentes podem esclarecer o benefício dessas alterações em programas de inseminação artificial, uma vez que o diluente ACP-101c foi capaz conservar a viabilidade do sêmen assim como teve seus parâmetros morfométricos pós-descongelação semelhantes aos encontrados no diluente TRIS.

8 PERSPECTIVAS

Estudos complementares da avaliação *in vivo* desses diluentes podem esclarecer o benefício dessas alterações em programas de inseminação artificial, uma vez que o diluente ACP-101c foi capaz conservar a viabilidade do sêmen assim como teve seus parâmetros morfométricos pós-descongelação semelhantes aos encontrados no diluente TRIS.

9 REFERÊNCIAS

AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, v.25, n.3, p.317-325, 2004.

ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ANEL, E.; de PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction of Domestic Animals*, v.41, n.2, p.30-42, 2006.

ARAÚJO, I. S. *Utilização da água de coco e do leite glicosado como diluidor do sêmen ovino*. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) – Faculdade de Veterinária. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 1990.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; GARCIA, A.R.; LIU, I.K.M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion head morphometry. *Theriogenology*, v.58, n.2, p.253-256, 2002.

BAKER, H.W.G; CLARKE, G.N. Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different observers. *Clinics in Reproduction and Fertility*, v.5, p.37-43, 1987.

BARKAWI, A. H.; ELSAYED, E. H.; ASHOUR, G.; SHEHATA, E. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Ruminant Research*, v. 66, n.1-3, p. 209-213, 2006.

BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISITIN, J.A. Estudo comparativo entre as provas rápidas e lenta de termorresistência para avaliação de sêmen congelado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.4, n.3-4, p.7-11, 1981.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, Iowa: Iowa University Press, 1989, 285p.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. *Applied Animal Reproduction*. New Jersey: Prentice-Hall, 1992, 478p.

BLUME, H.; MARQUES JR., A.P.V. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.18, n.3-4, p.97-104, 1994.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, v.60, n.8, 1539-1551, 2003.

CABRERA, F.; GONZALEZ, F.; BATISTA, M. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, p.191-195, 2005.

CALVETE J.J.; SOLÍS D.; SANZ, L.; DIAZ-MAURINO, T.; TÖPFER-PETERSEN, E. Glycosilated boar spermadhesin AWN-1 isoforms: biological origin, structural characterization by lectin mapping, localization of O-glycosylation sites and effect of glycosylation on ligand binding. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, v. 375, p. 667-673, 1994.

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W.U.; PINHEIRO, J.H.T.; FERREIRA, M.A.L.; ARAÚJO, A.A.; CRUZ, J.F. Conservação do sêmen caprino a 4°C durante o período seco e chuvoso no Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, n. 4, p. 620-624, 2003.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHÔA, 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, n.3-4, p.743-751, 2003.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.2, n.2, p.257-262, 2005.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. *Animal Reproduction Science*, v.92, n.3-4, p. 384-391, 2006.

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. *Animal Reproduction Science*, v.42, n.1, p.11-16, 2007.

CARVALHO, M. A. M.; NUNES, J. F.; GONDIM, J. M. Prolongamento da motilidade de espermatozoides de carpa comum, *Cyprinus carpio* L., pelo uso de água de coco (*Cocos nucifera*) como diluidor de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.5, p. 184-186, 2002.

CASEY, P.J.; GRAVANCE, C.G.; DAVIS, R.O. CHABOT, D.D.; LIU, I.K.M. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, v.47, n.2, p.575-582, 1997.

CBRA. *Manual para Exame e Avaliação de Sêmen Animal*. 2. ed., Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998, 79p.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. *Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1991, 223p.

CHENOWETH, P.J. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, v.64, n.3, p.457-468, 2005.

COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France. I Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reproduction Nutrition Development*, v.20, n.1-2, p.1789-1799, 1980.

COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Île-de-France. II. Fécondance: relation avec les critères qualitatifs observés in vitro. *Reproduction Nutrition Development*, v.21, n.3, p.399-407, 1981.

CORTELL, J.M. *Goat Production: Collection, Processing and Artificial Insemination of Goat Semen*. Academic Press: London, p. 171-191, 1981.

CURRY, M.R.; MILLAR, J.D.; TAMULI, S.M.; WATSON, P.F. Surface area and volume measurements for ram and human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 55, n.6, p.1325-1332, 1996.

DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. Effect on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. *International Journal of Animal Science*, v.10, p.127-128, 1995.

DERIVAUX, J. *Reprodução dos Animais Domésticos*. Zaragoza: Acribia, 1980, 435p.

DORADO, J.; HIDALGO, M.; MUNOZ, A.; RODRIGUÉZ, I. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Theriogenology*, v.112, n.1, p.150-157, 2009.

ESTESO, M.C.; SOLER, A.J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; QUINTERO-MORENO, A.A.; GARDE, J.J. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *Journal of Andrology*, v. 27, n. 5, p. 662-670, 2006.

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

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras*. Zaragoza: Editora Acribia, 1990, 192p.

FAUSTINO, L. R. *Sêmen humano criopreservado em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-113)*. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Biológicas. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2007.

FIGUEIRÊDO, E.L.; MONTEIRO, A.W.U.; SILVA FILHO, A.H.S.; CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F. Avaliação *in vitro* do sêmen ovino resfriado diluído em água de coco previamente criopreservado em nitrogênio líquido. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, n.1, p.430-431, 2001.

FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science*, v.75, n.1-2, p.119-139, 2003.

GARCIA-HERREROS, M.; BARÓN, F. J.; APARÍCIO, I. M.; SANTOS, A. J.; GARCÍA-MARÍN, L. J.; GIL, M. C. Morphometric changes in boar spermatozoa induced by cryopreservation. *International Journal of Andrology*, v.31, n.5, p.490-498, 2007.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-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, 2003.

GRAVANCE, C.G.; LEWIS, K.M.; CASEY, P.J. Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.44, n.7, p.989-1002, 1995.

GRAVANCE, G.G.; VISWANATH, R.; PITT, C.; CASEY, J. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*, v.46, n.7, p.1205-1215, 1996.

GRAVANCE, C.G.C.; WHITE, K.R.; ROBERTSON, Z.J.; CASEY, P.J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Animal Reproduction Science*, v. 49, n.1, p. 37-43, 1997.

GRAVANCE, C.G.; CHAMPION, Z.J.; CASEY, P.J. Computer assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.49, n.6, p. 1219-1230, 1998a.

GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D.L.; CASEY P.J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology*, v.19, n.6, p.704-709. 1998b.

GUBARTALLAH, K.A.; ANEL, A.A.; BAKHIET, O.; BABIKER, A. Comparative studies on reproductive performance of Nubian and Saanen Bucks under the climatic conditions of Khartoun. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.4, n.11, p.942-944, 2005.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. 7.ed., Barueri: Manole, 2004, 513p.

HIDALGO, M., RODRÍGUEZ, I., DORADO, J., SOLER, C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Veterinárni Medicína - Czech*, v.50, n.1, p.24-32, 2005.

HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J. M. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology*, v.66, n.4, p.996-1003, 2006.

HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science*, v.100, n.1-2, p.61-72, 2007.

HOLT, W.V.; VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, v. 127, p.527-535, 2004.

HOPKINS, S.M., EVANS, L.E. In: McDONALD, L.E. *Endocrinología Veterinária y Reproducción*. 4 ed. Interamericana: México, 1991.

IBGE/IPECE, *Perfil Básico Municipal*, 2009. Governo do Estado do Ceará. Disponível em <<http://www.ipece.ce.gov.br/>>. Acesso em: 25/02/2011.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal Reproduction and Fertility*, v.70, p.219-228, 1984.

KARABINUS, D.S.; VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; EVENSON; D.P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. *Journal of Andrology*, v. 18, n.5, p. 549-555, 1997.

KATO, S., SHIBUKAWA, T., HASAYAMA, H., *et al.* Timing of shedding and desintegration of cytoplasmic droplets from boar and goat spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, v.42, n.4, p. 237-241, 1996.

KATZ, D.F.; OVERSTREET, J.W.; SAMUELS S.J.; NISWANDER, P.W.; BLOOM, T.D.; LEWIS, E.L. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *Journal of Andrology*, n.4, v. 7, p. 203-210, 1986.

KRUGER T.F.; ACOSTA, A.A.; SIMMONS, K.F. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertility Sterility*, v.49, p.112-117, 1988.

LAMBRECHTS, H.; Van NIEKERK, F.E.; CLOETE, S.W. Sperm viability and morphology of two genetically diverse Merino lines. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 12, p. 337-344, 2000.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.

LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 37, n. 2, p.136-140, 2000.

MACHADO, R.; SIMPLICIO, A. A. Efeito do tipo racial e da época do ano sobre o ejaculado de caprinos criados em região semiárida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991, p.433.

MACHADO, V.P.; NUNES, J.F.; ARAÚJO, A.A.; FERNÁNDEZ, D.R.P.; CORDEIRO, M.A.; MEDEIROS, C.H.N.; MEDEIROS, A.L.N.; MONTEIRO, A.W.U. Fertilidade após inseminação artificial intracervical ou laparoscópica intrauterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, p. 43-49, 2006.

MACK, S.; WOLF, D.; TASH, J. Quantization of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. *Biology of Reproduction*, v. 38, p. 270-281, 1988.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S.; MOCÉ, E.; SILVESTRE, A.; GOMEZ, E.A.; VICENTE, J.S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, v. 52, n. 2, p. 295-304, 2006.

MARQUES, A. L. V. *Água de coco*. Informativo Soccego, nº 92, 1982.

MARTINEZ, M.L.; VERNEQUET, R.S.; TEODORO, R.L.; PAULA, R.O.; CRUZ, M.; CAMPOS, J.P.; RODRIGUES, L.H.; DE OLIVEIRAS, J.; VIEIRA, F.; BRUSCHI, J.H. Correlações entre características da qualidade do sêmen e a circunferência escrotal de reprodutores da raça Gir. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.3, p.700-706, 2000.

MATEOX-REX, E.; AGUILAR, C.G.C. Técnicas de control de la reproducción en ganado caprino. In: GARDE, J.J; GALLEGO, L. *Nuevas Técnicas de Reproducción Asistida Aplicadas a la Producción Animal*. Cuenca: Colección Estudios. Ediciones de la Universidad de Castilla La-Mancha, p.183-202, 1996.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, v.247, p.125-142, 1984.

MELO, M.A.P. *Água de coco em pó (ACP-104) adicionada de crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozoides de pirapitinga (Piaractus brachypomus) pós-descongelamento*. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 2010.

MIES FILHO, A.; DUTRA, J.; GIRÃO, R.N. Congelação do sêmen ovino na primavera. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 5, p. 27-57, 1982.

MIES FILHO, A. *Inseminação Artificial*. 6 ed. v.2. Porto Alegre: Sulina, 1987.

MONTEZUMA Jr., P.; VIANA NETO, R.; NUNES, J.F. Água de coco como diluidor de sêmen de cães. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DA UECE, 1994, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: UECE, 1994.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.

MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; HERMANN, A. Transbilayer motion of spin-labelled phospholipids in the plasma membrane of epididymal and ejaculated ram spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*, Colchester, v. 111, p. 81-89, 1997.

NEVES, J.P.; NUNES, J.F.; MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; SALGUEIRO, C.C.M.; ALMEIDA, J.L. *Inseminação artificial em pequenos ruminantes*. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2008.

NÖTHLING, J.O.; IRONS, P.C. A simple multidimensional system for the recording and interpretation of sperm morphology in bulls. *Theriogenology*, v. 69, p. 603-611, 2008.

NUNES, J. F. *Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc*. Tese (Ciências da Vida) – Paris: Université Paris, 1982.

NUNES, J.F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6., Belo Horizonte, 1985. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1985. p. 329-42.

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: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS, Brasília. *Anais...* Brasília. 1987.

NUNES, J. F. A inseminação artificial em caprinos no nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 12, p. 85-91, 1988.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; PRISCILA, L. *Utilisation d'une substance ativa "JYP" presents dans l'eau de coco pour la conservation in vitro et la fertilité dès spermatozoides de mammifères*. S.I.: S.N.: 1994.

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluente do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza, 1995.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; OLIVEIRA, L.F.; TEIXEIRA, M.D. Utilização da água de coco e suas frações ativas na conservação *in vitro* e avaliação *in vivo* do sêmen na espécie caprina. *Ciência Animal*, v.2, p.34, 1996.

NUNES, J.F.; CIRÍACO, A.L.T.; SUASSUNA, U. *Produção e Reprodução de Caprinos e Ovinos*, Fortaleza: Gráfica, 1997, 199p.

NUNES, J. F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 22, n. 2, p. 109-112. 1998.

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, p. 17-46, 1999.

NÚÑEZ-MARTINEZ, I.; MORAN, J.M.; PEÑA, F.J. Identification of sperm morphometric subpopulations in the canine ejaculate: do they reflect different subpopulations in sperm chromatin integrity? *Zygote*, v. 15, p. 257-266, 2007.

NUR, Z.; DOGAN, I.; GUNAY, U.; SOYLU, M.K. Relationship between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of Saanen goats. *Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy*, v.49, p.183-187, 2005.

O'MEARA, C.M.; HANRAHAN, J.P.; PRATHALINGAM, N.S.; OWEN, J.S.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; WARD, F.; EVANS, A.C.; LONERGAN, P. Relationship between *in vitro* sperm functional tests and *in vivo* fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.69, p.513-522, 2008.

- OLIVEIRA, R.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; CAVALCANTE, J.M.M.; MOURA, A.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, p. 862-869, 2009.
- OMBELET, W.; BOSMANS, E.; JANSEN, M.; COX, A.; VLASSELAER, J.; GYSELAERS, W.; VANDEPUT, H.; GIELEN, J.; POLLET, H.; MAES, M.; STEENO, O.; KRUGER, T.F. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in interpretation of semen testing. *Human Reproduction*, v.12. n.5, p.987-993, 1997.
- OYEYEMI, M.O.; ADETUNJI, V.O.; OLOBUKOLA, O.O. Effects of different planes of meat offals and soybean meal on the morphological characteristics of West African dwarf bucks. *Veterinary Archives*, v.76, p.159-165, 2006.
- PÉREZ, B., MATEOS, E. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malaguena breeds. *Small Ruminant Research*, v.23, p.23-28, 1996.
- PERIS S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal Andrology*, v.25, p.224-33, 2004.
- PINTADO, B.; FUENTE, J.; ROLDAN, E.R.S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoeschst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.118, p.145-152, 2000.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v. 63, p.215-225, 2005.
- RIBEIRO, S.D.A. *Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos*. São Paulo: Nobel, 1997. 318p.
- RITAR, A.J.; SALAMON, S. Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Australian Journal Biological Science*, v.35, p.293-303, 1982.

ROCA, J.; CARRIZORA, J.A.; CAMPOS, I. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina spermatozoa diluted in TRIS-egg yolk extender and stored at 5 °C. *Small Ruminant Research*, v.25, p.147-153, 1997.

RODRIGUES, A.P.R.; TORRES, M.Z.G.; OLIVEIRA, L.F.; NUNES, J.F. 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: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1996, Olinda. *Anais...* Olinda, 1994, 540p.

RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M.; DORADO, J.; PÉREZ, C.; SANZ, J. Effect of three staining procedures on the accuracy of image processing and stallion sperm head morphometry using sperm class analyzer (SCA). *Reproduction of Domestic Animals*, v.39, p.226, 2004.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. *Anais...* Goiânia. 2005.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of goat. *Nature*, v. 159, p.318-319, 1957.

RUBIO-GUILLÉN, J.; LÓPEZ-BREA, J.J.G.; ESTESO, M.C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; VILLALOBOS, D.M.G.; NAVEDA, R.P.; VELARDE, J.C.; MADRID-BURY, N.A.; SOTO-BELLOSO, E.; QUINTERO-MORENO, A.A. Head dimensions of Brahman and their crossbred bull spermatozoa are affected by cryopreservation. *Revista Científica*, v. 17, n. 5, 2007.

SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, v. 24, p. 167-173, 1996.

SALGUEIRO, C.C.M.; GONDIM, J.M.; NUNES, J.F. Artificial insemination of ewes with semen diluted on powder coconut water (ACP-102), cooled and stored for 48 hours at 4 °C. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v. 2, p. 374-374. 2004.

SANCHO, M.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; TABLADO, L.; de MONSERRAT, J.J.; SOLER, C. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology*, v. 50, n. 1, p. 27-37, 1998.

SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; JEFERSON, F.F.; BORGES, A.M.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; ROVAY, H. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *Revista Brasileira Zootecnia*, v.35, n.5, p.1934-1942, 2006.

SAS Institute. *SAS Procedures Guide*, version 9. SAS - Statistical Analysis System Institute, Cary. 2002.

SILVA, A.E.D.F.; NUNES, J.F. *Comportamento sexual de macho caprino da raça Moxotó sexual às variações estacionais no Nordeste do Brasil*. EMBRAPA-CNPC, Boletim de Pesquisa 6, 1988, 17p.

SILVA T.F.P.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; SILVA, L.D.M. Uso da água de coco em pó (ACP-117[®]) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. 2007. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Curitiba. *Anais...* p.191. Curitiba, 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.

SOBREIRA NETO, J. A. *Avaliação in vitro do sêmen equino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C*. Dissertação (Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária) Brasília: Universidade de Brasília, 70 p., 2008.

SOYLU, M.K.; DOGAN, I.; NUR, Z., et al. Evaluation of goat semen morphology after different staining methods. *Veteriner Fakulteri Dergesu*, Uludez Unisersitesi, v.22, n1, 39-43, 2003.

STREZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIK, A. Purification and partial characterization of a 5,700 Da sperm motility innibiting factor from seminal plasma of boar. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 29, p. 5-52, 1992.

TASSERON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.51, p.461-462, 1977.

THUNDATHIL, J.; PASZ, A.T.; BARTH, A.D., *et al.* The use of in vitro techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. *Animal Reproduction Science*, v.65, p.181-192, 2001.

THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; MILEHAM, A.J.; HOLT, W.V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology*, v. 22, n. 3, p. 382-394, 2001.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 14, p. 249-254, 1990.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M.I.; CAVALCANTE, S.G. Avaliação *in vitro* do sêmen suíno em BTS e na água de coco *in natura* e estabilizada. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.22, n.4, p. 198-201, 1998.

UPRETI, G.C.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. Development of a chemically defined ram semen diluent (RSD-1). *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.37, p. 143-157, 1995.

VALCARCEL A.; HERAS, M.A.; PEREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Animal Reproduction Science*, v. 45, p. 299-309, 1997.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.149-179, 2002.

VIANA, A.K.S.; CHALHOUB, M.; FILHO, A.L.B. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. *Ciência Animal Brasileira*, v.7, n.1, 67-76, 2006.

VIEIRA, M.J.A.F.; CARVALHO, M.A.M.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; ROMÃO, J.M.; OLIVEIRA, R.V.; SILVA NETO, A.R.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. Fertilização de óvulos de Tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), com uso de solução à base de água de coco em pó (ACP-104). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007. Belo Horizonte. *Anais...* p. 67. Belo Horizonte, 2007.

VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, N.A.; ÓRFÃO, L.H.; CARVALHO, M.A.M.; NUNES, J.F. Powder coconut water (ACP[®]) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 8., 2007. Saint Malo. *Proceedings...* Saint Malo, 2007, p.232.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60/61, p.481-492, 2000.

WILLIAMS, A.C.; FORD, W.C. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, v. 22, p. 680-695, 2001.

WINDSOR, D.P.; WHITE, I.G. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Animal Reproduction Science*, v.40, p.43-58, 1995.

ZAMIRI, M.J.; HEIDARI, A.H. Reproductive characteristics of Raylini male goats of Kerman province in Iran. *Animal Reproduction Science*, v. 96, p. 176-185, 2006.