

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

EUDES VIEIRA CASTRO

**ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTE AO SÊMEN OVINO DILUIDO EM
ÁGUA DE COCO EM PÓ ACP-102[®] E RESFRIADO A 5°C POR 48
HORAS**

**FORTALEZA
2011**

EUDES VIEIRA CASTRO

ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTE AO SÊMEN OVINO DILUIDO EM
ÁGUA DE COCO EM PÓ ACP-102[®] E RESFRIADO A 5°C POR 48
HORAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes

Co-orientadora: Dra. Cristiane Clemente de Melo Salgueiro

FORTALEZA
2011

C355a Castro, Eudes Vieira
Adição de antioxidante ao sêmen ovino diluído em água de coco em pó acp-102[®] e resfriado a 5°C por 48 horas/Eudes Vieira Castro _Fortaleza, 2011.
49 p.
Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes
Dissertação de Mestrado (Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.
1. Carneiros. 2. Espermatozoides. 3. Água de coco em pó. 4. Cisteína. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.080

EUDES VIEIRA CASTRO

ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTE AO SÊMEN OVINO DILUIDO EM
ÁGUA DE COCO EM PÓ ACP-102[®] E RESFRIADO A 5°C POR 48
HORAS

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: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. José Ferreira Nunes
Universidade Estadual do Ceará
Orientador

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

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

Prof^a. Dr^a. Tânia Vasconcelos Cavalcante
Universidade Federal do Tocantins
(Membro Externo)

Prof. Dr^a. Gyselle Viana Aguiar
Universidade Estadual do Ceará - RENORBIO
(Suplente)

*Dedico essa conquista a minha esposa
Cíntia, meus pais Diomar e Divina,
irmãos Diogo e Simone, Avôs
Francisco e Antônia, a toda minha
família e amigos. E em especial para
minha avó Ernestina que infelizmente
não está aqui para comemorar comigo
mais essa vitória. Amo todos vocês!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS pela fidelidade, por me consolar nas horas de dificuldade e desespero, por me dar força para estudar e desempenhar minhas atividades mesmo com tanta saudade e aperto no peito, pela família que tenho, por minhas amizades, e por todas as oportunidades que colocou ao meu alcance.

A Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária e Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos.

A Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa - FUNCAP pela concessão da bolsa, fator indispensável para o andamento e finalização do curso.

Ao Professor Doutor José Ferreira Nunes e a Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro pelas orientações, confiança, conhecimentos adquiridos durante este período, e por todo apoio desde minha chegada em Fortaleza.

A Professora Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley muito obrigado pela ajuda durante todo esse tempo.

A Professora Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcante, pelos conhecimentos, incentivos e oportunidades concedidas desde o período de graduação, pela amizade e convivência meu muito obrigado.

Agradecer de forma muito especial a quem sempre esteve ao meu lado incentivando, torcendo e sofrendo junto comigo nos momentos difíceis, vocês foram com certeza o principal motivo desta conquista, Meus pais Diomar e Divina, minha esposa Cíntia, irmãos Simone e Diogo, avós Francisco e Antônia, padrinhos Ivoney e Leny, a minha cunhada Maria José, a todos os tios, primos, e aos meus irmãos de luta Cleidson, Liliane, Oscar, Saul e Murad.

A todos integrantes do Núcleo Integrado de Biotecnologia que contribuíram direta e indiretamente para o meu aprendizado, tanto com brincadeiras como em apoio, confiança e amizade sou grato a vocês: Barbara, Juliana, Jota, Edgar, Cibele, Aline, Ruan, Mateus, Carla, Érica, Marcelo, Aldália, Nathalie, Cássia, Liliane, Miriam, Mônica, Felipe, Julia, Marcia, Tadeu, Henna, Divens, Enrrique, Renan, Gonzaga, Iraci, Luma, Nicodemos, Vitor, Antônio.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a cinética e vitalidade espermática do sêmen ovino diluído em ACP-102[®], acrescido de 5 ou 10 mM de cisteína e conservado a 5 °C por 48 horas. Foram utilizados cinco reprodutores ovinos da raça Dorper, alocados no Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará. As coletas seminais foram realizadas a cada 48 horas. Os ejaculados obtidos foram agrupados para constituírem um *pool*. Sendo em seguida, dividido em três alíquotas; uma diluída apenas em ACP-102[®] (grupo controle), e as outras duas em ACP-102[®] + 5 ou 10 mM de cisteína (T1 e T2, respectivamente). As análises *in vitro* foram realizadas nos tempos de 0, 12, 24 e 48 horas de refrigeração a 5°C. Quanto à cinética, foram mensurados a velocidade linear (VSL), a velocidade curvilínea (VCL), a velocidade do percurso médio (VAP), a linearidade (LIN), a retilinearidade (STR), o deslocamento lateral de cabeça (ALH), a frequência de batimento cruzado (BCF), o índice de oscilação (WOB), a motilidade total (MT) e a motilidade progressiva (MP). Foi realizado o teste de integridade de membrana utilizando o corante eosina-nigrosina. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, nos quais os parâmetros que apresentaram distribuição normal foram comparados pelo teste de Duncan, e os que não apresentaram foram comparados pelo teste não paramétrico de Friedman. De maneira geral, a adição do antioxidante ao meio ACP-102[®] não incrementou a qualidade espermática. O grupo controle manteve a motilidade progressiva por mais tempo que os grupos T1 e T2 (24h, 12h e 0h, respectivamente). Já com relação à motilidade total, o grupo T1 mostrou-se similar ao controle, mantendo a mesma motilidade inicial até 24h. No que se refere ao percentual de espermatozoides rápidos, os grupos T1 e T2 foram superiores ($p < 0,05$) ao grupo controle imediatamente após a diluição, porém o controle foi melhor que o T2 nos tempos de 24 e 48 horas. Conclui-se então que o meio ACP-102[®] mostrou maior eficácia quando utilizado sem a adição de cisteína, mantendo os parâmetros de motilidade viáveis até 48 horas de conservação a 5°C.

Palavras-chave: Carneiros, Espermatozoides, Água de coco em pó. Cisteína.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the kinetics and vitality of ram semen extended in PCW-102 plus 5 or 10 mM cysteine, and stored at 5 °C for 48 hours. Five breeding Dorper, allocated at the Biotechnology Integrated Nucleus of the Ceará State University. The seminal samples were taken each 48 hours. The ejaculates were grouped to form a pool. And then divided into three aliquots: one diluted only in PCW-102 (control group), and the other two in PCW-102 + 5 or 10 mM cysteine (T1 and T2, respectively). The *in vitro* assays were performed on 0, 12, 24 and 48 hours of refrigeration. Regarding the kinetics, were taken into consideration: straight/line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), linearity (LIN), straightness (STR), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat/cross frequency (BCF), wobble (WOB), total motility (TM) and progressive motility (PM). The membrane integrity test was performed using the staining eosin-nigrosine. Data were submitted to normality test, where the parameters with normal distribution were compared by Duncan's test, and those who had not normal distribution were compared by nonparametric Friedman test. In general, the addition of antioxidant to PCW-102 medium did not promote improvement in sperm quality. The control group maintained progressive motility longer than T1 and T2 (24h, 12h and 0h, respectively). Related to the total motility, T1 was found to be similar to control, maintaining the same initial motility within 24 hours. Respect to the percentage of rapid spermatozoa, T1 and T2 were significantly higher than the control group immediately after dilution, but control was better than T2 at 24 and 48 hours. Thus, we conclude that the medium PCW-102 showed greater efficacy without the addition of cysteine, maintaining motility parameters viable up to 48 hours.

Keywords: Ram. Esperma. Powder coconut water. Cisteine.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Coloração vital de eosina-nigrosina em espermatozoide ovino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102 [®]) conservado a 5 °C por 48 horas; espermatozoide vivo sem coloração e morto com coloração avermelhada..... | 32 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Sêmen ovino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102®) (controle), adicionado de 5 mM (T1) ou 10 mM de cisteína (T2), conservado a 5 °C por até 48 horas, quanto aos parâmetros de espermatozoides móveis totais (MT), motilidade progressiva (MP) e espermatozoides rápidos (ER), em percentual..... 35
- Tabela 2 - Média e erro padrão dos parâmetros cinéticos de velocidades espermáticas e vitalidade em sêmen ovino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102®) (controle), adicionado de 5 mM (T1) ou 10 mM de cisteína (T2), conservado a 5 °C por até 48 horas..... 37

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Parâmetros cinéticos obtidos com análise computadorizada de sêmen..... | 17 |
| Quadro 2 - Composição do diluidor à base de água de coco em pó ACP..... | 19 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------|--|
| μL | Microlitro |
| μm | Micrômetro |
| ACP-102 [®] | Água de coco em pó (diluyente seminal ovinos) |
| ALH | Amplitude do deslocamento lateral da cabeça |
| BCF | Frequência do batimento cruzado |
| CASA | Análise de sêmen auxiliada por computador |
| ER | Espermatozoides rápidos |
| GPx | Glutamina peroxidase |
| GR | Glutaciona redutase |
| GSH | Glutaciona reduzida |
| GSSG | Forma oxidada da glutaciona |
| HZ | Heats |
| IA | Inseminação artificial |
| LIN | Linearidade |
| mM | Milimolar |
| mOsm | Miliosmol |
| MP | Motilidade progressiva |
| MT | Motilidade total |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SCA | Sperm class analyzer |
| Sptz | Espermatozóide |
| STR | Retilinearidade |
| TRIS | Hidroximetil aminometano |
| VAP | Velocidade média do percurso |
| VCL | Velocidade curvilinear |
| MIP | Motilidade individual progressiva |
| WOB | Índice de oscilação |
| NADPH | Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP ⁺) |

| | |
|--------|--|
| NIB | Núcleo integrado de biotecnologia |
| H2O | Água |
| T1 | Tratamento 1 |
| T2 | Tratamento 2 |
| SAS | Statistical analysis system |
| FUNCAP | Fundação cearense de apoio ao desenvolvimento e pesquisa |
| VSL | Velocidade em linha reta |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SEMINAL..... | 16 |
| 2.2 ANÁLISE DO SÊMEN AUXILIADA POR COMPUTADOR.... | 16 |
| 2.3 DILUIÇÃO SEMINAL..... | 18 |
| 2.4 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES..... | 20 |
| 2.5 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL..... | 21 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 23 |
| 4. HIPÓTESE CIENTÍFICA..... | 24 |
| 5. OBJETIVOS..... | 25 |
| 5.1 OBJETIVO GERAL..... | 25 |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 25 |
| 6. CAPITULO 1..... | 26 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 41 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 42 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |

1. INTRODUÇÃO

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas são imprescindíveis quando se visa o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos, destacando a inseminação artificial (IA) como sendo a técnica mais importante já idealizada para o melhoramento genético de animais (NUNES, 2002). Esta técnica pode ser realizada utilizando sêmen fresco, resfriado ou congelado.

Em ovinos os primeiros ensaios sobre a inseminação artificial (IA) foram realizados no início do século XX por Ivanov que analisou meios diluentes e a reprodução assistida visando desenvolver um método prático de inseminação nas fazendas. Depois da Primeira Guerra Mundial, com estudos mais intensivos dirigidos por Milovanov, a IA com sêmen *in natura* e refrigerado passou a ser usada em larga escala nos programas reprodutivos dos ovinos (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Porém esta tecnologia ainda apresenta alguns entraves, destacando entre estes a sensibilidade dos espermatozoides as crioinjúrias e inerentes as fêmeas no qual a anatomia tortuosa da cervix impede a transposição atraumática do aplicador, resultando em baixas taxas de fertilidade quando realizado a inseminação cervical superficial com sêmen congelado (MAXWELL E WATSON, 1996; GHALSASI e NIMBKAR, 1996; NAQVI et al., 1998 e YOSHIDA, 2000) relataram uma limitação na inseminação artificial em ovinos com sêmen congelado devido à baixa fertilidade com o uso da técnica intracervical.

Como alternativa para alcançar taxas de gestação aceitáveis tem sido utilizado à inseminação artificial por laparoscopia. Entretanto, esta é uma técnica invasiva e de alto custo (EVANS e MAXWELL, 1990). Levando em consideração a tendência mundial e o incentivo ao desenvolvimento de biotécnicas que respeitem o bem estar animal, uma alternativa seria o desenvolvimento de um meio diluidor que confere um maior tempo de viabilidade aos espermatozoides mantidos sob refrigeração.

No tocante às inovações biotecnológicas, a água de coco vem sendo amplamente utilizada em vários segmentos da reprodução animal. Excelentes resultados têm sido obtidos com a utilização da água de coco em estudos de preservação do sêmen de animais domésticos como caprinos (SALLES, 1989; ARAÚJO, 1990; RODRIGUES et al., 1994; SALGUEIRO et al., 2003), ovinos (CRUZ, 1994; SOUSA et al., 1994), suínos (TONIOLLI & MESQUITA, 1990), caninos (MONTEZUMA Jr. et al., 1994; UCHOA et al., 2002), peixe de água doce como o tambaqui (*Colossoma macropomum*

CUVIER) (FARIAS et al. 1999).

Estudos tem demonstrado uma melhoria da qualidade cinética dos espermatozoides com o advento da adição de substâncias que combatam as espécies reativas de oxigênio (BUCAK et al. 2007), podendo mostrar resultados diferentes quando adicionado ao diluente ACP-102[®]

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Avaliação da qualidade seminal

A fim de prever a capacidade fecundante de espermatozoides os ejaculados deverão ser analisados quanto: volume, aspecto, turbilhão ou movimento de massa, motilidade, vigor, concentração, morfologia espermática além de ser recomendado provas de integridade de membrana e teste de termo-resistência (MIES FILHO, 1987; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Rotineiramente, a concentração espermática é determinada com auxílio de espectrofotometria ou de microscopia, utilizando-se a câmara de Neubauer (SANTOS et al., 2006). 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; 0-5), (NUNES et al., 2002; 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).

A vitalidade espermática está diretamente relacionada à seletividade da membrana plasmática. Esta pode ser avaliada através de colorações vitais, Sendo utilizados corantes como a eosina-nigrosina, azul de tripan (BEARDEN e FUQUAY, 1992) e azul de bromofenol (DERIVAUX, 1980). Nas células as quais a membrana plasmática foi danificada, a ausência da seletividade permite a passagem do corante, e conseqüentemente corando os espermatozoides mortos, as células consideradas vivas ainda possuem a funcionalidade da membrana plasmática dessa forma não são coradas (BEARDEN e FUQUAY, 1992).

2.2. Análise do sêmen auxiliada por computador

A análise de sêmen auxiliada por computador (CASA) é definida como um sistema automatizado para digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozoides, fornecendo informação acurada, precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozóide e também resumos estatísticos da população espermática (AMANN e KATZ, 2004). Permitindo desta forma maior objetividade e rapidez, uma vez que esta é realizada numa fração do tempo bem menor daquela gasta na avaliação subjetiva (MOTIMER, 1997).

A análise computadorizada gera informações sobre parâmetros, como: velocidade do percurso curvilíneo (VCL), velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), índice de oscilação (WOB), frequência de batimento cruzado (BCF) e deslocamento lateral da cabeça (ALH), obtendo desta forma uma análise mais acurada e precisa sobre a cinética espermática (MOTIMER, 1997) como pode ser visualizado no quadro 1.

Quadro 1: Parâmetros cinéticos obtidos com a análise computadorizada de sêmen.

| Parâmetro | Sigla | Unidade | Descrição |
|---|--------------|----------------|---|
| Velocidade curvilínea | VCL | µm/s | Velocidade da trajetória real do espermatozóide |
| Velocidade média da trajetória | VAP | µm /s | Velocidade da trajetória média do espermatozóide |
| Velocidade linear | VSL | µm /s | Velocidade em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e último ponto da trajetória do espermatozóide |
| Linearidade | LIN | % | Relação percentual entre VSL e VCL |
| Retilinearidade | STR | % | Relação percentual entre VSL e VAP |
| Índice de oscilação | WOB | % | Relação percentual entre VAP e VCL |
| Amplitude do deslocamento lateral da cabeça | ALH | µm | Deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real em relação à trajetória média ou linear |
| Frequência do batimento cruzado | BCF | Hz | Frequência que a cabeça do espermatozóide atravessa a trajetória média. |

Apesar de se obter vários parâmetros as VCL, VAP, VSL são comumente utilizadas para descrição geral do movimento do espermatozóide, entretanto, para uma avaliação adicional, foram estabelecidos os parâmetros STR, LIN e WOB, que tratam das relações entre estas velocidades (MOTIMER, 1997).

2.3. Diluição seminal

- Diluentes para conservação seminal

Vários diluentes seminais são utilizados na criopreservação de células espermáticas. Além de aumentar o potencial reprodutivo dos machos, a utilização de um diluente visa preservar a motilidade espermática e a integridade da membrana plasmática.

Para tanto, os sistemas tampões são adicionados aos diluidores para neutralizar os íons de hidrogênio produzidos pelos espermatozoides e assegurar um pH entre 6.8 a 7.1, sendo o citrato de sódio e o TRIS (hidroximetil aminometano) os tampões mais utilizados para sêmen ovinos. Para substrato exógeno de energia são utilizados glicose, frutose, e manose. A fim de controlar a proliferação e transmissão de microorganismos entre animais é acrescentado antibiótico ao diluente, sendo mais utilizado as penicilinas e a estreptomicina (BORGES, 2008).

Durante o resfriamento é necessário a utilização de crioprotetores que reduzem o choque térmico. Estes, podem ser classificados como crioprotetores intracelulares (pequenas moléculas como: glicerol, etilenoglicol, acetamida, dimetilsulfóxido) ou extracelulares (proteínas do leite, gema de ovo, lactose, rafinose, trealose, metilcelulose), A gema de ovo é o crioprotetor externo mais utilizado no processo de resfriamento e congelamento de sêmen. Seus fosfolipídios, como a fosfatidilcolina (lecitina), interagem com a membrana espermática ocupando partes específicas dos lipídios de membrana (BORGES, 2008).

- Diluentes à base de água de coco

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (NUNES et al. 1996), 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 formação do diluidor deve ter seis meses de idade. Entretanto, nesta idade a água apresenta pH ácido (4.5) e osmolaridade elevada (500 mOsm/Kg) o que dificultaria a sobrevivência celular. Logo, tornou-se necessário 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*.

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 Brasileiro. Entretanto, a água de coco apresenta dificuldades quando à conservação por longos períodos após sua extração do fruto, limitações na disponibilidade do fruto em regiões onde há a carência do vegetal, além de variações na constituição bioquímica da água de coco entre diferentes frutos, o que incentivou o desenvolvimento do produto água de coco em pó (ACP), onde os constituintes nutricionais da água de coco são obtidos em sistema de desidratação a alto vácuo. O ACP caracteriza-se por possuir composição padronizada, obtida 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 ovino, a formulação ACP-102® foi desenvolvida.

Quadro 2: Composição do diluidor à base de água de coco in natura

| Açúcares | mg/mL |
|----------------------|------------------|
| Sacarose | 8,9 |
| Glicose | 2,46 |
| Frutose | 2,51 |
| Vitaminas | mg/mL |
| Ácido Nicotínico | 0,64 |
| Ácido Pantotênico | 0,52 |
| Biotina | 0,02 |
| Riboflavina | 0,01 |
| Ácido Fólico | 0,003 |
| Tiamina e Piridoxina | Traços |
| Minerais | mg/100 mL |
| Potássio | 312,0 |
| Cloro | 183,0 |
| Sódio | 105,0 |
| Fósforo | 37,0 |
| Magnésio | 30,0 |
| Enxofre | 24,0 |
| Ferro | 0,1 |
| Cobre | 0,04 |
| Cálcio | Traços |
| Aminoácidos | µg/mL |
| Ácido Aspártico | 5,4 |
| Ácido Glutâmico | 78,7 |
| Serina | 65,8 |
| Glicina | 13,9 |
| Asparagina | 10,4 |
| Treonina | 26,3 |
| Alanina | 177,1 |
| Glutamina | 13,4 |
| Lisina | 22,5 |
| Arginina | 16,8 |

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Prolina | 21,6 |
| Valina | 15,1 |
| Leucina | 31,6 |
| Fenilalanina | 10,2 |
| Tirosina | 3,1 |
| Ácido Aminobutírico | 168,8 |
| Homoserina | 5,2 |
| Histina, Metionina e Hidroxiprolina | Traços |

Fonte: Nunes et al.(1996)

2.4. Radicais livres e Antioxidantes

Durante o período de estocagem do sêmen, a produção de radicais livres tem sido apontada como a principal causa da diminuição de motilidade e integridade espermática (VISWANATH e SHANNON, 1997) e declínio do metabolismo energético (BAUMBER et al., 2000). Estudos tem demonstrado uma melhoria da qualidade cinética dos espermatozoides com adição de substâncias que combatam as espécies reativas de oxigênio, no meio diluente sendo utilizado diversas substâncias como: vitaminas E e C, trolox, catalase, superóxido dismutase, cisteamina, cisteína, selênio, etc., que possivelmente atuam como antioxidantes combatendo os radicais livres (BUCAK et al. 2007).

Os radicais livres são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons sendo altamente energéticos e instáveis, dessa forma, podem causar injurias oxidativas em membranas lipídicas, danificando ácidos nucléicos e despolimerizando ácidos hialurônicos. Quanto maior o grau de insaturação, maior será a suscetibilidade à oxidação, o que torna a membrana espermática rica em ácidos graxos poliinsaturados altamente sensível às espécies reativas de oxigênio (OCHSENDORF, 1999).

Os danos espermáticos promovidos pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) normalmente ocorrem quando há uma perturbação no equilíbrio entre a quantidade de ROS produzidas e a quantidade removida pelo sistema antioxidante, sendo que pequenas quantidades de ROS são necessárias para o funcionamento normal das células, durante a capacitação espermática e durante o processo de fecundação (MAIA e BICUDO, 2009).

Os antioxidantes atuam fornecendo hidrogênio para o radical livre estabilizando-o. Assim o antioxidante torna-se um radical livre, porém o mesmo possui a propriedade de poder se reajustar em um conjunto estável. Naturalmente as células possuem um sistema de defesa antioxidante enzimático (superóxido dismutase, catalase, glutathione

peroxidase, glutathione reductase, etc.) e não enzimático (vitamina C, vitamina E, selênio, ubiquinonas, ácidos úrico e ácido lipóico) (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

A cisteína é um aminoácido de baixo peso molecular contendo tiol, trata-se de um antioxidante não enzimático que previne a peroxidação lipídica (BILODEAU et al., 2001). Estudos avaliando a adição de diferentes concentrações de cisteína ao diluidor Tris empregado para a congelamento de sêmen ovino, demonstraram que a concentração de 10 mM teve efeito positivo sobre a manutenção das características espermáticas (UYSAL e BUCAK 2007) e as concentrações de 5 e 10 mM promoveram um aumento na taxa de motilidade pós descongelamento, porém, não apresentaram diferenças significativas nos outros parâmetros como: viabilidade, % de anomalias acrossômicas e integridade de membrana (BUCAK et al. 2007).

Já em caprinos a inclusão de cisteína 5, 10 e 15mM não promoveu melhoria na motilidade espermática quando comparado com grupo controle, no entanto 15 mM teve a motilidade significativamente superior que 5 mM (ATESSAHIN et al. 2008). Em suínos, a adição de cisteína (2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mM) ao diluente BTS não promoveu efeitos significativos sobre a viabilidade de espermatozoides suínos resfriados (SEVERO, 2009).

A incubação aeróbica, a contaminação por leucócitos e o excesso de resíduo citoplasmático do espermatozóide levam a formação de ROS que provocam efeitos deletérios as membranas espermáticas, diminuição da motilidade e eventualmente queda do potencial de fertilidade (AITKEN e BAKER, 2004; ALVAREZ et al., 1987).

A cisteína é precursora da biossíntese da glutathione e aumenta os níveis de glutathione reduzida (GSH) (BILODEAU et al., 2001), que é capaz de agir diretamente em muitas ROS (MEISTER, 1994), além de ser um co-fator para a glutathione peroxidase (GPx) que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos. A forma oxidada da glutathione (GSSG) é regenerada *in vivo* pela glutathione reductase (GR) e NADPH (BILODEAU et al., 2001). A glutathione peroxidase é uma selenocisteína contendo uma enzima antioxidante, que além de auxiliar na eliminação de peróxidos, também age na desintoxicação de lipídios reativos (FRIDOVICH, 1983).

2.5. Inseminação Artificial (IA)

A inseminação artificial é uma biotécnica amplamente utilizada na reprodução animal. Consiste em introduzir, por meios instrumentais, o sêmen nas vias genitais da

fêmea em condições tais que permitam aos espermatozoides encontrar o óvulo e fecundá-lo (SANTOS et al., 2006). Pode ser realizada por via transcervical, por laparotomia ou laparoscopia, utilizando-se sêmen fresco, resfriado ou congelado.

A praticidade aliada ao importante papel exercido pelos reprodutores na disseminação de material genético dentro dos rebanhos, consagrou esta biotécnica como uma das mais importantes ferramentas dentro de um programa de melhoramento genético (NUNES et al., 2002; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Segundo a lenda, a inseminação teve início com árabes em 1332 em eqüinos. Porém, cientificamente, só teve início em 1779, com o monge italiano Lázaro Spallanzani que demonstrou ser possível a fecundação de uma fêmea sem o contato direto com o macho, colheu sêmen de um cachorro através de excitação mecânica e o aplicou em uma cadela em cio, a qual veio a parir três filhotes (MIES FILHO, 1987).

Dentre vários pontos positivos da inseminação artificial pode-se destacar a possibilidade de utilização do sêmen de animais de alto valor zootécnicos em vários lugares ao mesmo tempo, possibilidade de cruzamentos entre raças usando raças altamente especializadas e outra já aclimatada, controle de doenças venéreas, elimina a necessidade de um grande número de reprodutores situados em uma mesma propriedade, facilita o manejo dos animais, por possuírem um controle zootécnico, permite a utilização de animais com incapacidade de monta (adquirida) e mesmo de animais que já morreram (MIES FILHO, 1987; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

No Brasil insemina-se aproximadamente 5% das fêmeas bovinas, obtendo taxas aceitáveis de gestação (ASBIA, 1980). Já a aplicabilidade da IA em ovinos ainda possui entraves, um deles é a disposição tortuosa dos anéis cervicais que impossibilita a transposição atraumática do aplicador, obtendo-se desta forma baixas taxas de gestação com a utilização de sêmen congelado, sendo necessária técnica mais laboriosa, como a inseminação por laparoscopia, para se obter taxas aceitáveis, ou ainda utilizar a inseminação com o sêmen fresco ou refrigerado (SÖDERQUIST et al., 1999).

Segundo Evans e Maxwell (1990), o período máximo de conservação do sêmen a 5°C, para obtenção de um grau aceitável de fertilidade através da inseminação artificial, é de 24 horas para ovinos e de 48 horas para caprinos em diluentes à base de leite desnatado.

3. JUSTIFICATIVA

O rebanho ovino nordestino, em sua maioria, é composto por animais sem padrão racial definido e de baixa produtividade. Sendo assim, a inseminação artificial poderá contribuir de maneira significativa incrementando e auxiliando ponderal e numericamente o ganho genético dos ovinos. Para tal a conservação seminal por resfriamento ou congelação ainda é um entrave no melhoramento desta biotécnica.

Trabalhos têm demonstrado que as adições de algumas substâncias antioxidantes aos diluidores reduzem a peroxidação lipídica e os efeitos tóxicos das reações oxigênio espécie-específicas, melhorando parâmetros de motilidade do sêmen *in vitro* (BUCAK et al.2007).

Baseado em estudos que utilizaram à água de coco como meio diluente seminal para várias espécies animais como: caprinos (NUNES, 1998; CAMPOS et al., 2003), cães (MONTEZUMA Jr. et al., 1994; CARDOSO et al., 2006), equinos (SOBREIRA NETO, 2008), peixes (CARVALHO et al., 2002; VIVEIROS et al., 2008), suínos (TONIOLLI e MESQUITA, 1990) e para ovinos (ARAÚJO, 1990; FIGUERÊDO et al., 2001) juntamente com a falta de estudos que acrescentem estas substâncias antioxidantes a este diluente tentando melhorar os parâmetros cinéticos dos espermatozoides diluídos e resfriados por 48 horas, já que estas possíveis características avaliadas *in vitro* poderão mostrar evidências de incremento da fertilidade das fêmeas ovinas.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

A adição de antioxidantes como a cisteína ao meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102®) promoverá uma melhoria dos parâmetros cinéticos e viabilidade do sêmen ovino mantido sob refrigeração a 5°C por até 48 horas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição da cisteína ao diluente ACP-102® sobre os parâmetros cinéticos e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides ovinos refrigerado e conservado a 5°C por 48 horas.

5.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os parâmetros cinéticos do sêmen fresco e resfriado a 5°C por 0,12, 24 e 48 horas, utilizando diluente ACP-102® acrescido com 5 ou 10 mM de cisteína, por meio da análise computadorizada.
- ✓ Predizer a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides por meio da coloração vital (eosina-nigrosina) durante os diferentes períodos de armazenamento (0,12, 24 e 48 horas).

6. CAPITULO 1

Efeito da adição de cisteína ao sêmen ovino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102[®]) e conservado a 5°C por 48 horas

Effect of cysteine addition to ram semen extended in media based on powder coconut water (PCW-102[®]) and preserved at 5 °C for 48 hours

Periódico: Ciência Rural (submetido em: junho de 2011)

Efeito da adição de cisteína ao sêmen ovino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102®) e conservado a 5 °C por 48 horas

Effect of cysteine addition to ram semen extended in media based on powder coconut water (PCW-102) and preserved at 5 °C for 48 hours

Eudes Vieira Castro^I José Ferreira Nunes^I Cristiane Clemente de Mello Salgueiro^{II}

^I Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil. ^{II} ACP Biotecnologia.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a cinética e vitalidade espermática do sêmen ovino diluído em ACP-102[®], acrescido de 5 ou 10 mM de cisteína, e conservados a 5 °C por 48 horas. Foram utilizados cinco reprodutores ovinos da raça Dorper, alocados no Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará. As coletas seminais foram realizadas a cada 48 horas. Os ejaculados obtidos foram agrupados para constituir um *pool*. E, em seguida, dividido em três alíquotas: uma diluída apenas em ACP-102[®] (grupo controle), e as outras duas em ACP-102[®] + 5 ou 10 mM de cisteína (T1 e T2, respectivamente). As análises *in vitro* foram realizadas nos tempos de 0, 12, 24 e 48 horas de refrigeração. Quanto à cinética, foram levadas em consideração: a velocidade linear (VSL), a velocidade curvilínea (VCL), a velocidade do percurso médio (VAP), a linearidade (LIN), a retilinearidade (STR), o deslocamento lateral de cabeça (ALH), a frequência de batimento cruzado (BCF), o índice de oscilação (WOB), a motilidade total (MT) e a motilidade progressiva (MP). Foi

realizado o teste de integridade de membrana utilizado o corante eosina-nigrosina. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, nos quais os parâmetros que apresentaram distribuição normal foram comparados pelo teste de Duncan, e os que não apresentaram comparados pelo teste não paramétrico de Friedman. De maneira geral, a adição do antioxidante ao meio ACP-102® não incrementou a qualidade espermática. O grupo controle manteve a motilidade progressiva por mais tempo que os grupos T1 e T2 (24h, 12h e 0h, respectivamente). Já com relação à motilidade total, o grupo T1 mostrou-se similar ao controle, mantendo a mesma motilidade inicial até 24h. No que se refere ao percentual de espermatozoides rápidos, os grupos T1 e T2 foram superiores ao grupo controle imediatamente após a diluição, porém o controle foi melhor que o T2 nos tempos de 24 e 48 horas. Desta forma, conclui-se que o meio ACP-102® mostrou maior eficácia quando utilizado sem a adição de cisteína, mantendo os parâmetros de motilidade viáveis até 48 horas.

Palavras-chave: *ovinos, sêmen, água de coco em pó, antioxidantes.*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the kinetics and vitality of ram semen extended in PCW-102 plus 5 or 10 mM cysteine, and stored at 5 °C for 48 hours. Five breeding Dorper, allocated at the Biotechnology Integrated Nucleus of the Ceará State University. The seminal samples were taken each 48 hours. The ejaculates were grouped to form a pool. And then divided into three aliquots: one diluted only in PCW-102 (control group), and the other two in PCW-102 + 5 or 10 mM cysteine (T1 and T2, respectively). The *in vitro* assays were performed on 0, 12, 24 and 48 hours of refrigeration. Regarding the kinetics, were taken into consideration: straight/line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), linearity

(LIN), straightness (STR), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat/cross frequency (BCF), wobble (WOB), total motility (TM) and progressive motility (PM). The membrane integrity test was performed using the staining eosin-nigrosine. Data were submitted to normality test, where the parameters with normal distribution were compared by Duncan's test, and those who had not normal distribution were compared by nonparametric Friedman test. In general, the addition of antioxidant to PCW-102 medium did not promote improvement in sperm quality. The control group maintained progressive motility longer than T1 and T2 (24h, 12h and 0h, respectively). Related to the total motility, T1 was found to be similar to control, maintaining the same initial motility within 24 hours. Respect to the percentage of rapid spermatozoa, T1 and T2 were significantly higher than the control group immediately after dilution, but control was better than T2 at 24 and 48 hours. Thus, we conclude that the medium PCW-102 showed greater efficacy without the addition of cysteine, maintaining motility parameters viable up to 48 hours.

Key words: *ram, semen, powder coconut water, antioxidants.*

INTRODUÇÃO

A grande capacidade dos ovinos em adaptar-se aos modernos sistemas de exploração, uma maior produção de carne por hectare/ano, além da facilidade de manejo, faz com que a ovinocultura propicie uma maior produtividade em relação às criações tradicionais como a bovinocultura, tornando a criação de ovinos ideal para pequenos produtores e da agricultura familiar, perfil fundiário predominante no Nordeste (IBGE, 2007).

Os índices reprodutivos influenciam o nível produtivo de um rebanho. O uso do sêmen diluído criopreservado se destaca entre as técnicas aplicadas por

conservar a capacidade fecundante dos espermatozoides por prolongados períodos em refrigeração.

No tocante às inovações biotecnológicas, a água de coco em pó tem sido amplamente utilizada em vários segmentos da reprodução animal com resultados bastante satisfatórios em estudos de conservação seminal de animais domésticos, preservando a motilidade espermática em caprinos (SALGUEIRO et al., 2003), ovinos (CRUZ, 1994), suínos (TONIOLLI & MESQUITA, 1990), caninos (UCHOA et al., 2002) e em peixe de água doce como o Tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER 1818) (FARIAS et al., 1999).

Durante o período de estocagem do sêmen, a produção de radicais livres tem sido apontada como a principal causa de diminuição da motilidade e integridade espermática (VISWANATH & SHANNON, 1997) e declínio do metabolismo energético (BAUMBER et al., 2000). Estudos têm demonstrado uma melhoria da qualidade cinética dos espermatozoides com adição de substâncias que combatem as espécies reativas de oxigênio (ROS) no meio diluente (BUCAK et al., 2007). Dentre os agentes estudados, a cisteína, um aminoácido de baixo peso molecular, considerado antioxidante não enzimático, precursor da biossíntese de glutathione (BILODEAU et al., 2001), tem sido adicionada com sucesso ao diluente TRIS na criopreservação de sêmen ovino (BUCAK et al., 2007). Entretanto, não há informações disponíveis na literatura a cerca da adição de antioxidantes ao meio à base de água de coco em pó (ACP-102[®]) na conservação seminal. Neste contexto, o presente estudo foi realizado no intuito de avaliar a cinética e viabilidade espermática do sêmen ovino diluído em ACP-102[®] acrescido de cisteína e conservado em refrigeração a 5°C por 48 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido durante o mês de junho de 2010, no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará, na cidade de Fortaleza, localizado a 3°47'35,60'' latitude sul, 38°33'30,09'' longitude oeste, a 28 metros acima do nível do mar, com pluviosidade anual aproximada de 1600 mm, temperatura média de 27 °C e umidade relativa média do ar de 77%, sendo considerada uma cidade de clima tropical quente e seco.

Foram utilizados cinco carneiros da raça Dorper de fertilidade comprovada, com 2-5 anos de idade. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em sistema de manejo intensivo, sendo alimentados com 400g de concentrado comercial (20% de proteína bruta), feno de Tifton (*Cynodon* sp.), sal mineral e água *ad libitum*. As coletas foram realizadas a cada 48 horas com auxílio de uma vagina artificial e os ejaculados agrupados constituindo um *pool*, totalizando oito *pools* com intuito de eliminar as diferenças individuais entre animais.

Imediatamente após as coletas, cada *pool* foi avaliado quanto à concentração espermática (câmara hematimétrica), motilidade massal (microscopia óptica), integridade de membrana (coloração vital eosina-nigrosina) e parâmetros cinéticos (análise computadorizada): percentual de espermatozoides móveis (MT-%); percentual de espermatozoides com movimento progressivo (MP-%); velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$); velocidade linear (VSL- $\mu\text{m/s}$); velocidade média do percurso (VAP- $\mu\text{m/s}$); linearidade (LIN-%); retilinearidade (STR-%); índice de oscilação (WOB-%); deslocamento lateral de cabeça (ALH- μm); e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz).

O meio ACP-102[®] (3,77g; pH 7.0; 300 mOsm/kg H₂O) foi diluído em 50 mL de água destilada, conforme recomendação do fabricante (ACP Biotecnologia) e acrescido de 0,4 mg/mL de gentamicina. Em seguida, foi dividido em três alíquotas:

uma sem adição de antioxidante (grupo controle), uma adicionada de 5 mM de cisteína (T1), e outra de 10 mM de cisteína (T2). O sêmen foi diluído, em cada uma das alíquotas, até alcançar uma concentração final de 1×10^9 espermatozoides/mL, sendo então refrigerado de 32 a 5 °C em 100 minutos (0,27 °C/min.). As amostras foram mantidas a 5 °C em um refrigerador, sendo realizadas avaliações de integridade de membrana e cinética às 0,12, 24 e 48 horas de conservação.

Para avaliação da viabilidade espermática, amostras contendo 5 µL de sêmen rediluído em ACP-102[®] (concentração 40×10^6 sptz/mL) e 5 µL do corante vital eosina-nigrosina foram depositados sobre uma lâmina pré-aquecida a 37 °C e preparado o esfregaço, em seguida avaliadas em microscopia de luz. Foram contados 200 espermatozoides por amostra e calculado o percentual de células vivas, considerando viáveis ou inviáveis as células coradas ou não coradas, respectivamente (Figura 1).

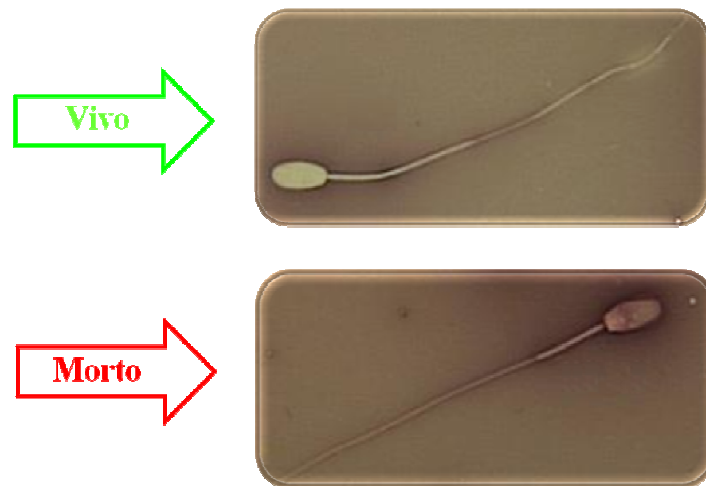


Figura 1 – Coloração vital de eosina-nigrosina em espermatozoide ovino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102[®]) conservado a 5 °C por 48 horas; espermatozoide vivo sem coloração e morto com coloração avermelhada.

As análises cinéticas foram realizadas em sistema CASA com uso do software *Sperm Class Analyzer* (SCA[®], Microoptics S.L, Barcelona, Espanha). utilizando os seguintes parâmetros do programa: 25 quadros/s; número de quadros: 25/campo; velocidade limite para espermatozoides lentos: 30µm/s; limite para velocidade média: 60 µm/s. Para esta análise, o sêmen foi rediluído em ACP-102[®] até alcançar uma concentração de 40×10^6 spz/mL, e 10 µL desta suspensão foram colocados entre lâmina e lamínula a 37 °C e avaliado um mínimo de 200 espermatozoides por amostra, usando microscópio de contraste de fase com objetiva de 10x. Os seguintes parâmetros foram avaliados: MT, MP, VCL, VAP, LIN, STR, ALH, WOB e BCF.

As variáveis estudadas foram submetidas aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de Assimetria e Curtose, por meio do procedimento UNIVARIATE, com as opções NORMAL e PLOT do SAS (SAS, 2002). Variáveis que se encontraram fora da curva normal de distribuição foram submetidas a procedimentos de transformação. Os dados percentuais foram submetidos à transformação angular [arco-seno ($\sqrt{X/100}$)] e os dados não percentuais transformados logaritmicamente [$\log(X+1)$] para aproximá-los da distribuição normal e, posteriormente, as análises foram realizadas utilizando o PROC MIXED do pacote estatístico SAS. Os dados transformados que não se enquadraram na curva normal, mesmo após a transformação, foram considerados não paramétricos. Desta forma, as variáveis não normalizadas foram comparadas pelo teste não paramétrico de Friedman, onde, inicialmente, foi realizado o ordenamento das observações por meio do PROC RANK do SAS e, em seguida, a análise dos ordenamentos pelo PROC MIXED. Adicionalmente, para avaliar a manutenção dos parâmetros espermáticos ao longo do tempo foi realizada uma avaliação individual para cada tratamento ao longo do período de conservação,

utilizando o teste de Duncan por meio do procedimento GLM do SAS. Foi utilizado um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste experimento não foi visualizado diferença significativa no percentual de espermatozoides com membranas integras (vivos) entre os tratamentos e nem entre os tempos de armazenamento.

Ao comparar a motilidade total entre os diferentes tratamentos nos diversos tempos, o T1 e controle foram similares, mantendo a motilidade até 24h, já o T2, apresentou uma redução significativa após 12h de conservação quando comparado com os demais tratamentos. T2 apresentou 63,97% de motilidade total com 24h de conservação resultado este inferior ao controle 79,41%, não diferindo após 48h (Tabela 1).

Quanto ao percentual de espermatozoides com motilidade progressiva, os grupos controle e T1 foram significativamente superiores a T2 com 12h de conservação (50,9%; 62,58%; e 47,42%, respectivamente) e ambos os tratamentos foram significativamente inferiores ao controle com 24h, não havendo diferença ao término do período de 48h. Avaliando os diferentes tempos de conservação dentro do mesmo tratamento, verificou-se que o grupo controle manteve a motilidade progressiva similar ao sêmen fresco por até 24h, enquanto o T1 manteve similar até 12h e T2 reduziu significativamente a motilidade progressiva, independente do tempo de conservação, quando comparado ao sêmen fresco – 0h (Tabela 1).

Tabela 1 – Sêmen ovino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102®) (controle), adicionado de 5 mM (T1) ou 10 mM de cisteína (T2), conservado a 5 °C por até 48 horas, quanto aos parâmetros de espermatozoides móveis totais (MT), motilidade progressiva (MP) e espermatozoides rápidos (ER), em percentual

| Tempo | Parâmetro | Controle | T1 | T2 |
|--------------|------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 0h | MT | 79,50 ± 5,78 ^{Aa} | 84,55 ± 9,03 ^{Aa} | 83,27 ± 3,64 ^{Aa} |
| | MP | 62,16 ± 5,26 ^{Aa} | 72,46 ± 6,10 ^{Aa} | 62,94 ± 3,18 ^{Aa} |
| | ER | 66,64 ± 6,68 ^{Aa} | 58,94 ± 2,74 ^{ABa} | 47,04 ± 6,34 ^{Ba} |
| 12h | MT | 80,87 ± 2,88 ^{Aa} | 85,80 ± 2,94 ^{Aa} | 76,96 ± 5,52 ^{ABb} |
| | MP | 50,90 ± 5,63 ^{ABa} | 62,58 ± 3,46 ^{Aa} | 47,42 ± 4,47 ^{Bb} |
| | ER | 59,73 ± 4,38 ^{Aa} | 45,00 ± 4,74 ^{Bb} | 38,66 ± 7,76 ^{Ba} |
| 24h | MT | 79,41 ± 4,39 ^{Aa} | 70,37 ± 5,52 ^{ABab} | 63,97 ± 5,75 ^{Bbc} |
| | MP | 58,50 ± 3,49 ^{Aa} | 44,47 ± 4,57 ^{Bb} | 38,73 ± 3,15 ^{Bb} |
| | ER | 38,70 ± 4,90 ^{ABb} | 32,65 ± 3,75 ^{Bc} | 50,54 ± 3,16 ^{Aa} |
| 48h | MT | 57,10 ± 6,29 ^{Ab} | 62,63 ± 7,70 ^{Ab} | 47,28 ± 6,58 ^{Ac} |
| | MP | 33,86 ± 5,03 ^{Ab} | 36,91 ± 6,77 ^{Ab} | 27,25 ± 4,43 ^{Ac} |
| | ER | 29,35 ± 5,53 ^{ABb} | 24,37 ± 4,09 ^{Bc} | 36,85 ± 5,11 ^{Aa} |

Letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença estatística entre tratamentos e minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatística entre os tempos de conservação a 5°C (p<0,05).

Após 12 horas de resfriamento, nota-se um aumento significativo no percentual de espermatozoides rápidos no T1 (66,6% - 59,7%) (p<0,05) quando comparado ao controle (47,0% - 38,6%), não diferindo a partir de 24h. O T2 foi similar ao controle e T1 antes da refrigeração e não diferiu de T1 com 24 ou 48h de conservação. Avaliando os diferentes tempos de refrigeração dentro do mesmo tratamento, o grupo controle manteve o percentual de espermatozoides rápidos semelhante ao sêmen fresco até 48h. Já o T1 apresentou uma redução significativa após 24h e o T2 após 12h (Tabela 1).

Os danos espermáticos promovidos pelas ROS normalmente ocorrem quando há uma perturbação no equilíbrio entre a quantidade de ROS produzidas e a quantidade removida pelo sistema antioxidante, sendo que pequenas quantidades de ROS são necessárias para o funcionamento normal das células (MAIA & BICUDO, 2009). Neste presente trabalho a adição de cisteína nas concentrações de 5 ou 10 mM não promoveu nenhum efeito positivo sobre a cinética e viabilidade de espermatozoides ovinos diluídos em ACP-102[®] e conservados a 5 °C por 48h. De maneira geral os trabalhos com antioxidantes apresentam resultados variáveis e isso é esperado diante das inúmeras variáveis que influenciam o resultado final como constituição natural de antioxidantes no plasma seminal, pressão de oxigênio no interior dos tubos durante o resfriamento, tamanho de tubos, volume de sêmen diluído armazenado.

Desta forma a adição de antioxidante ao ACP-102[®], que já possui em sua composição natural antioxidantes não enzimáticos como a vitamina C, juntamente com um certo ambiente de anaerobiose durante o resfriamento (As alíquotas resfriadas em tubos ependorfs cheios) pode ter interferido no equilíbrio entre radicais livres e antioxidantes, reduzindo a produção de radicais livres juntamente com aumento de substâncias com propriedade antioxidantes, o que pode ter ocasionado a redução da motilidade progressiva no T2 e T1 antes das 24 horas, sendo que essa redução no grupo controle só foi visualizada após 24h.

Quanto aos parâmetros VCL, VSL, LIN, VAP, STR, WOB, BCF, percentagem de espermatozoides com velocidade lenta e média não houve diferença significativa entre os três grupos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2 – Média e erro padrão dos parâmetros cinéticos de velocidades espermáticas e vitalidade em sêmen ovino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102®) (controle), adicionado de 5 mM (T1) ou 10 mM de cisteína (T2), conservado a 5 °C por até 48 horas.

| Parâmetro | Controle | T1 | T2 |
|------------|--------------|--------------|--------------|
| VAP (µm/s) | 78,61 ± 5,87 | 78,91 ± 7,13 | 75,38 ± 7,70 |
| VSL (µm/s) | 63,95 ± 7,21 | 62,12 ± 7,49 | 63,06 ± 7,40 |
| VCL (µm/s) | 96,79 ± 4,16 | 97,23 ± 3,41 | 92,39 ± 4,03 |
| LIN (%) | 65,43 ± 5,91 | 65,30 ± 7,37 | 66,87 ± 8,02 |
| STR (%) | 81,09 ± 2,40 | 81,20 ± 2,06 | 82,47 ± 1,93 |
| WOB (%) | 80,43 ± 3,22 | 80,29 ± 2,59 | 80,67 ± 3,20 |
| ALH (µm) | 2,99 ± 0,52 | 3,03 ± 0,58 | 2,99 ± 0,56 |
| BCF (Hz) | 8,91 ± 4,45 | 8,98 ± 4,77 | 8,85 ± 4,77 |
| MÉDIOS (%) | 10,36 ± 1,96 | 10,30 ± 2,07 | 10,13 ± 2,51 |
| LENTOS (%) | 15,59 ± 2,72 | 14,43 ± 2,03 | 17,97 ± 2,61 |
| VIVOS (%) | 67,45 ± 0,18 | 68,86 ± 0,13 | 60,18 ± 0,15 |

($p > 0,05$). VAP = velocidade do percurso médio, VSL = velocidade linear, VCL = velocidade curvilínea, LIN = linearidade, STR = retilinearidade, WOB = índice de oscilação, ALH = deslocamento lateral de cabeça, BCF = frequência de batimento cruzado, MÉDIOS = porcentagem espermatozoides com velocidade média, LENTOS = porcentagem espermatozoides com velocidade lenta, VIVOS = porcentagem de espermatozoides não corados pela coloração vital de eosina-nigrosina.

Estudos avaliando a adição de diferentes concentrações de cisteína ao diluente TRIS empregado para a congelamento de sêmen ovino demonstraram que a concentração de 10 mM teve efeito positivo sobre a manutenção das características espermáticas (UYSAL & BUCAK, 2007) e as concentrações de 5 e 10 mM promoveram um aumento na taxa de motilidade pós-descongelamento (BUCAK et al., 2007). Já em caprinos, a inclusão de cisteína a 5, 10 e 15 mM não promoveu melhoria na motilidade espermática quando comparado com grupo controle, no entanto, o

tratamento com 15 mM teve a motilidade significativamente superior a 5 mM (ATESSAHIN et al., 2008). Em suínos, a adição de cisteína (2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mM) ao diluente BTS não promoveu efeitos significativos sobre a viabilidade de espermatozoides refrigerados (SEVERO, 2009).

Apesar de que o percentual de espermatozoides rápidos do grupo controle ter sido inferior imediatamente após a diluição que em T1 e T2, o mesmo manteve a mesma qualidade até 48h.

CONCLUSÃO

A adição da cisteína nas concentrações de 5 e 10 mM ao diluidor ACP – 102 promoveu uma redução nos percentuais de motilidade progressiva, sugerindo que a utilização do ACP-102[®] sem o acréscimo deste antioxidante é mais apropriado para o resfriamento do sêmen ovino a 5 °C.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

ATESSAHIN, A.; BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; KIZIL, M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v.77, p.38-44, 2008.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability,

acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895-902, 2000.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂ – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.56, p.275-288, 2001.

BUCAK, M.N.; ATESSAHIN, A.; VARISLI, O.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluron on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067, 2007.

CRUZ, J.F. **Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido à temperatura de +4°C por um período de 48 horas diluído em frações ativas da água de coco**. 1994. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará.

FARIAS, J.O.; NUNES, J.F.; CARVALHO, M.A.M. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER) conservado à temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica Produção Animal**, n.1, p.44-58, 1999.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2007**, 2007.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SICHERLE, C.C.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v.85, p.85-90, 2009.

SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; SAMPAIO NETO, J.C.; NUNES, J.F. Utilização de diferentes diluentes e métodos de congelamento do sêmen de bodes da

raça Murciano-Granadina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.625-630, 2003.

SEVERO, C.K. **Avaliação da adição de cisteína no sêmen resfriado para inseminação em suínos**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria.

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.

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

UYSAL, O.; BUCAK, M.N.. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. **Acta Vet.**, v.76, p.383-390, 2007.

VISWANATH, R.; SHANNON, P. Do sperm cell age? A review of the physiological change in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.321-331, 1997.

7. CONCLUSÕES

A adição de antioxidantes aos diluidores apresentam uma grande variação nos resultados devido a uma gama de fatores que influenciam no equilíbrio entre radicais livres produzidos e removidos pelos sistemas antioxidantes e neste trabalho a adição de cisteína nas concentrações de 5 e 10 mM ao diluidor ACP-102[®] promoveu uma redução nos percentuais de progressiva em relação ao grupo controle, e não promoveu nenhum efeito positivo sob os demais parâmetros avaliados sugerindo que a utilização do ACP-102[®] sem o acréscimo deste antioxidante é mais apropriado para o resfriamento do sêmen ovino a 5 °C.

8. PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como perspectiva, uma melhoria das técnicas usuais de processamento de sêmen ovino de forma torná-las mais aplicáveis, especialmente em futuro trabalho de mensuração da fertilidade do sêmen resfriado por longo período de conservação, já que o sêmen congelado desta espécie não apresenta resultados favoráveis de fertilidade quando se utiliza métodos de inseminação tradicional, ou seja via cervical- normal nas condições de criação ovina no Brasil, principalmente na região Nordeste.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.*, Collingwood, v. 16, n. 5, p. 581–588, May 2004.

ALVAREZ, J. G. et al . Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.*, Schaumburg, v.8, n. 5, p. 338-348, Sept./Oct. 1987.

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

ARAÚJO, A. A. Utilização da água de coco "in natura" com adição de gema de ovo como diluidor do sêmen caprino. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará, 1990.

ASBIA. *Manual do Inseminador*. 48p. Ipiranga -SP, 1980.

ATESSAHIN, A.; BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; KIZIL, M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*, v.77, p.38-44, 2008.

AURICH, J.E.; SCHÖNHER, R. U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, v.48, p.185-192, 1997.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, v.21, p.895-902, 2000.

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

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂ – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v.56, p.275-288, 2001.

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, p.97-104, 1994.

BORGES, J. C. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro* / Tese - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Jaboticabal, 2008.

BUCAK M. N.; ATESSAHIN, A.; VARISLI, O.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology* v.67, p. 1060-1067, 2007

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*, Belo Horizonte, v. 27, n. 4, p. 620-624, 2003.

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, p. 384-391, 2006.

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 (*Coccus nucifera*) como diluidor de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.5, p. 184-186, 2002.

- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*, 2ª Ed., Belo Horizonte, 1998.
- CHEMINEAU, P.; COGNIE, 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, Italy, p. 223, 1991.
- CRUZ, J. F. Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido à temperatura de +4°C por um período de 48 horas diluído em frações ativas da água de coco. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1994.
- DERIVAUX, J. *Reprodução dos Animais Domésticos*. Zaragoza, Editora Acribia, 1980.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Editora Acribia, Zaragoza, 192 p., 1990.
- FARIAS, J. O., NUNES, J. F., CARVALHO, M. A. M., et al. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER) conservado à temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. *Rev. Cient. Prod. Anim.*, v.1, n.1, p.44-58, 1999.
- FIGUEIREDO, 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.
- FRIDOVICH, I. Superoxido radical: an exogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Palo Alto, v. 23, p. 239-257, Apr. 1983.
- GHALSASI, P. M.; NIMBKAR, C. Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes. *Small Ruminant Res.*, v. 23, p. 69-673, 1996.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7.ed., Barueri-SP: Manole, 513p, 2004.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo 2007*, 2007.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SICHERLE, C.C.; SOUSA, D.B.;
RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk
extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Research*, v.85, p.85-90,
2009.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram
semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 42, p. 55-65, 1996.

MEISTER A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Canc. Res.*, Philadelphia,
v. 54, p. 1969-1975, Apr. 1994, supplement.

MIES FILHO, A. *Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial*. 6ªed.
v.2, Porto Alegre - RS, 1987.

MONTEZUMA Jr., P. A., VIANA NETO, R., NUNES, J. F. Utilização da água de coco
"in natura", com adição de gema de ovo, como diluente de congelamento do sêmen canino,
em paillets de 0,5ml. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA
VETERINÁRIA, 1994, Olinda. *Anais...* p.535, Olinda, 1994.

MOTIMER, 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.

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; BAG, S.; PAREEK, S. R.; MITTAL, J. P. Cervical
penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using
frozen-thawed semen. Technical note. *Small Ruminant Res.*, v. 29, p. 329-333, 1998.

NORDBERG J ARNÉR ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the
mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology e Medicine*, v.31, p.1287-1312,
2001.

NUNES J.F. Inseminação artificial em caprinos. In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 340p, 2002.

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

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.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reative oxygen species. *Human Reproduction*, v .5, p. 399-420, 1999.

RODRIGUES, A. P. R., TORRES, M. Z. G., OLIVEIRA, L.F., et al. Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como diluidores do sêmen caprino. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1994, Olinda. *Anais...* p.540, Olinda, 1994.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci*, v. 62. p. 77-111, 2000.

SALGUEIRO, C. C. M., MATEOS-REX, E., SAMPAIO NETO, J. C., NUNES, J. F. Utilização de diferentes diluentes e métodos de congelamento do sêmen de bodes da raça Murciano-Granadina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 2003.

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

- 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. *Rev. Bras. Zootec.* v.35, n.5, p.1934-1942, 2006.
- SEVERO, C.K. Avaliação da adição de cisteína no sêmen resfriado para inseminação em suínos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. 2009.
- SOBREIRA NETO, J.A. Avaliação in vitro do sêmen eqüino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C. Brasília, DF. Dissertação (Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, 70 p , 2008.
- SÖDERQUIST, L., LUNDEHEIM, N. E NILSSON, B. Assessment of fertility after using different procedures to thaw ram spermatozoa frozen in mini straws. *Reproduction Dom Animal*, v34, p. 61-66, 1999.
- SOUSA, N. M., TEIXEIRA, M. D. A., OLIVEIRA, L. F. Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidor do sêmen ovino. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1994, Olinda. *Anais...Olinda*, 1994, p.583.
- 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.
- UCHOA, D. C., CARDOSO, R. C. S., SILVA, L. D. M. Inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer com diferentes diluidores de sêmen. *Rev. Bras. Reprod. Anim., Supl.*, n.5, p.150-152, 2002.
- UYSAL, O.; BUCAK, M.N.. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet.*, v.76, p.383-390, 2007.

VISWANATH, R.; SHANNON, P. Do sperm cell age? A review of the physiological chance in sperm during storage at ambient temperature. *Reproduction, Fertility and Development*, v.9, p.321-331, 1997.

VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, N.A.; ÓRFÃO, L.H.; CARVALHO, A.M.; NUNES, J.F. Powder coconut water (ACP[®]) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. *8^o ISRPF*, Santo Malo, França, 2008, p. 137.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 349-355, 2000.