

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

BÁRBARA MARA BANDEIRA SANTOS

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO E OVINO EM
DILUENTE DE ORIGEM VEGETAL À BASE DE ÁGUA DE COCO EM
PÓ SEM ADIÇÃO DE GEMA DE OVO**

FORTALEZA

2013

BÁRBARA MARA BANDEIRA SANTOS

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO E OVINO EM
DILUENTE DE ORIGEM VEGETAL À BASE DE ÁGUA DE COCO EM
PÓ SEM ADIÇÃO DE GEMA DE OVO**

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

**FORTALEZA
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho
Bibliotecário Responsável – Francisco Welton Silva Rios – CRB-3/919

S237c

Santos, Bárbara Mara Bandeira

Criopreservação de sêmen caprino e ovino em diluente de origem vegetal à base de água de coco em pó sem adição de gema de ovo / Bárbara Mara Bandeira Santos . -- 2013.
CD-ROM. 64 f. ; il. (algumas color.) : 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

1. Água de coco em pó. 2. Óleo de coco extravirgem. 3. Sêmen caprino. 4. Conservação seminal. I. Título.

CDD: 633

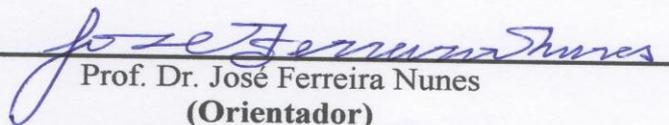
BÁRBARA MARA BANDEIRA SANTOS

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO E OVINO EM
DILUENTE DE ORIGEM VEGETAL À BASE DE ÁGUA DE COCO
EM PÓ SEM ADIÇÃO DE GEMA DE OVO

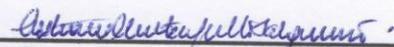
Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 10/07/2013

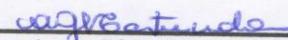
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Ferreira Nunes

(Orientador)
Universidade Estadual do Ceará


Profa. Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro

(Examinadora)
RENORBIO – Universidade Potiguar


Dra. Ana Gláudia Vasconcelos Catunda

(Examinadora)
Universidade Estadual do Ceará

Aos meus pais.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradecer a Deus por tudo na minha vida, com Ele tudo é possível.

Meu agradecimento mais que especial aos meus pais e irmãos, que são tudo na minha vida.

A toda família Santos & Bandeira, que estão sempre presentes, me dando confiança e amor.

Ao meu orientador professor Dr. José Ferreira Nunes, pelos ensinamentos e pela confiança depositada.

À Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro agradeço por toda minha vida científica. Você foi essencial na minha formação. Muito obrigada.

À Dra. Ana Gláudia Vasconcelos Catunda e a Dra Gyselle Viana Aguiar pela ajuda indispensável e amizade.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), através da sua equipe de professores, secretários e coordenadores, pela contribuição na minha formação profissional.

À CAPES pela bolsa de estudo durante o período de mestrado.

Aos queridos colegas de graduação e pós graduação. Só agente sabe como foi difícil chegar até aqui, mas com vocês tudo se tornou melhor.

Aos colegas e amigos de laboratório, por todo carinho, conversas, risadas, ensinamentos e ajuda.

Em especial aos amigos: Juliana Ribeiro, Bruna Farias, Brandinice de Almada, Nayra Carvalho, Lívia Antunes, Leonardo Cabral, Juliana Fernandes, Priscila Farias, Sérvulo Maia e Igor Barroso.

RESUMO

Na conservação seminal é necessária a utilização de diluentes que forneçam nutrientes e protejam as células espermáticas contra o choque térmico. É comum o uso de aditivos de origem animal aos diluentes, o que implica em riscos sanitários. Desta forma, o Capítulo 1 deste estudo objetivou desenvolver um meio de conservação seminal, para caprinos, livre de substâncias de origem animal, à base de água de coco adicionada de óleo de coco extravirgem, e o Capítulo 2 objetivou avaliar o efeito de diferentes diluentes (TRIS + 15% gema de ovo; ACP-102[®] + 15% gema de ovo e ACP-102[®]), na qualidade do sêmen ovino refrigerado e conservado a 5 °C por 24 horas. No Capítulo 1, os ejaculados de quatro reprodutores caprinos foram diluídos no meio de criopreservação à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionada de óleo de coco extravirgem (OC) e glicerol (GLI), constituindo-se nos tratamentos T1 (ACP-101c + 2,5% OC + 7% GLI) e T2 (ACP-101c + 4% OC + 7% GLI). O sêmen diluído foi refrigerado até atingir a temperatura de 4 °C e em seguida congelado em vapores de nitrogênio líquido (-60 °C). Imediatamente após a diluição do sêmen fresco e após a descongelação, as amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos através do software *Sperm Class Analyser*. Em todos os parâmetros analisados o tratamento T2 obteve resultados superiores aos observados no T1. De acordo com o resultado, conclui-se que o meio de criopreservação à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de óleo de coco extravirgem é eficaz para criopreservação do sêmen caprino. No Capítulo 2, o ejaculado de 4 carneiros foram reunidos em um *pool* e em seguida diluído nos seguintes tratamentos : T1 = TRIS + 15% gema de ovo; T2 = ACP-102[®] + 15% gema de ovo e T3 = ACP-102[®]. Após a diluição foram refrigerados a 5 °C e conservados nessa temperatura até 24 horas. Os parâmetros cinéticos espermáticos foram avaliados através do software *Sperm Class Analyser* nos tempos de 0, 6 e 24 horas de resfriamento. A viabilidade espermática foi avaliada nos diferentes tempos de conservação através da técnica de coloração eosina-nigrosina. O diluente ACP-102[®] adicionado ou não de gema de ovo foi significativamente superior ao diluente TRIS nos parâmetros de motilidade progressiva e linearidade na conservação do sêmen ovino por 24 horas. O diluente ACP-102[®] adicionado ou não de gema de ovo é capaz de manter a qualidade do sêmen ovino refrigerado a 5° C e armazenado por até 24 horas, sendo indicado como alternativa viável ao diluente comercial TRIS.

Palavras-chave: Água de coco em pó. Óleo de coco extravirgem. Sêmen caprino. Sêmen caprino. Conservação seminal

ABSTRACT

To sperm conservation is necessary to use extenders that provide nutrients and protect sperm cells against cold shock. It is common to use animal additives to extenders, which can involve health risks. Thus the Chapter 1 of this study aimed to develop a goat seminal extender free of animal products based on coconut water added with extra virgin coconut oil, and Chapter 2 aimed to evaluate the effect of different extenders (TRIS + 15% egg yolk; ACP-102[®] + 15% egg yolk and ACP-102[®]) on the quality of ram sperm cooled and stored at 5 ° C for 24 hours. In Chapter 1, the ejaculates of four bucks were diluted in the a cryopreservation extender based on powdered coconut water (ACP-101c) with extra virgin coconut oil (OC) and glycerol (GLY), constituting in T1 (ACP-101c OC + 2.5% + 7% GLY) and T2 (ACP-101c OC + 4% + 7% GLY). The diluted sperm was cooled to the temperature of 4 ° C and then frozen in liquid nitrogen vapor (-60 ° C). Immediately after dilution of fresh sperm and after thawing, the samples were analyzed for the kinetic parameters through software Sperm Class Analyser. In all parameters the treatment T2 obtained results superior to those observed in T1. According to the result, it is concluded that the cryopreservation extender based on powder coconut water (ACP-101c) added with extra virgin coconut oil is effective for cryopreservation of goats sperm. In Chapter 2, the ejaculate of four ram were *pooled* and then diluted in the following treatments: T1 = TRIS + 15% egg yolk, T2 = ACP-102[®] + 15% egg yolk and T3 = ACP-102[®]. After dilution were chilled to 5 ° C and kept at that temperature for up to 24 hours. The kinetic parameters were evaluated using the sperm Sperm Class Analyser software at times 0, 6 and 24 hours of cooling. The sperm viability was evaluated at different storage times by staining technique eosin-nigrosin. The diluent ACP-102[®] with or without the addition of egg yolk was significantly higher than TRIS in motility and linearity parameters in ram sperm preservation for 24 hours. The diluent ACP-102[®] is able to maintain the quality of ram semen cooled to 5 ° C and stored for up to 24 hours and is indicated as an alternative to commercial diluent TRIS.

Keywords: Powdered coconut water. Extra virgin coconut oil. Goat sperm. Sheep sperm. Sperm conservation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio à base de 36
água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de 2,5% de óleo de
coco extravirgem e de 7% de glicerol (1ª avaliação).
- Figura 2 - Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio à base de 36
água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de 4% de óleo de coco
extravirgem e de 7% de glicerol (1ª avaliação).
- Figura 3 - Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio à base de 37
água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de 2,5% de óleo de
coco extravirgem e de 7% de glicerol (2ª avaliação).
- Figura 4 - Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio à base de 37
água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de 4% de óleo de coco
extravirgem e de 7% de glicerol (2ª avaliação).

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 -	Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de óleo de coco extravirgem (T1 (ACP-101c + 2,5% óleo de coco extravirgem + 7% glicerol); e T2 (ACP-101c + 4% óleo de coco extravirgem + 7% glicerol)).	38
------------	--	----

Capítulo 2

Tabela 1-	Médias e erros-padrão ajustados das variáveis motilidade total (MT), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade média do percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$) em função dos diluentes utilizados (T1: Tris +15% de gema de ovo; T2: ACP-102 [®] + 15% de gema de ovo e T3: ACP-102 [®]) no sêmen ovino	47
Tabela 2 -	Médias e erros-padrão ajustados das variáveis motilidade progressiva (MP, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), amplitude lateral da cabeça do espermatozoide (ALH, $\mu\text{m/s}$) e frequência de batimento cruzado (BCF, Hz) em função da interação diluente (T1: Tris + 15% de gema de ovo; T2: ACP-102 [®] + 15% de gema de ovo e T3: ACP-102 [®]) e do tempo de conservação (0, 6 e 24 horas) a 5 °C do sêmen ovino.	48
Tabela 3	Média, erros-padrão e percentuais de viabilidade espermática, comparados em função do tratamento (T1: Tris + 15% de gema de ovo; T2: ACP-102 [®] + 15% de gema de ovo e T3: ACP-102 [®]) e do tempo de conservação (0, 6 e 24 horas) a 5 °C do sêmen ovino.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	: Água de coco em pó
ACP-101c	: Meio de congelação de sêmen caprino à base de água de coco em pó
ACP-102	: Meio de conservação de sêmen ovino à base de água de coco em pó
ACP-106	: Meio de conservação de sêmen canídeo à base de água de coco em pó
ALH	: Amplitude lateral da cabeça do espermatozoide
BCF	: Frequência de batimento cruzado do espermatozoide
BU-III	: Fração proteica do plasma seminal produzida pelas glândulas bulbouretrais
CASA	: <i>Computer-assisted Sperm Analysis</i> (Análise de sêmen auxiliada por computador)
CBRA	: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
ER%	: percentual espermatozoides rápidos
GLI	: Glicerol
HOST	: <i>Hypertonic Swelling Test</i> (Texto Hiposmótico)
IAA	: Ácido 3-indol acético
LDL	: Lipoproteínas de baixa densidade
LIN	: Linearidade
LTSCO	: Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino
MIP	: Motilidade individual progressiva
mOsmol	: Miliosmoles
MP	: Motilidade progressiva
MP%	: Percentual de motilidade progressiva
MT%	: Percentual de espermatozoides móveis totais
NIB	: Núcleo Integrado de Biotecnologia
OC	: Óleo de coco extra virgem
PEM	: Percentagem de espermatozoides móveis
pH	: Potencial hidrogeniônico
PPGCV	: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Sptz	: Espermatozoide
STR	: Retilinearidade
SCA	: <i>Sperm Class Analyzer</i>

TRIS : Tris (hidroximetil) aminometano
UECE : Universidade Estadual do Ceará
VAP : Velocidade média no percurso
VCL : Velocidade curvilínea
VSL : Velocidade linear progressiva

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Sêmen	14
2.2. Avaliações seminais.....	14
2.3. Diluentes seminais.....	16
2.4. Meio de conservação seminal à base de água de coco.....	17
2.5. Crioprotetores.....	19
2.5.1 Gema de ovo.....	20
2.6. Óleo de coco.....	22
2.7. Conservação seminal.....	23
2.8. Refrigeração.....	24
2.9. Congelação.....	25
3. JUSTIFICATIVA	27
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1. Objetivo geral.....	29
5.2. Objetivos específicos.....	29
6. CAPÍTULO 1	31
7. CAPÍTULO 2	42
8. CONCLUSÃO	53
9. PERSPECTIVAS	54
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

Na criopreservação seminal é necessário à utilização de um diluente que forneça energia, proteja as células contra danos relacionados a baixas temperaturas e mantenha um ambiente adequado para a sobrevivência espermática (EVANS; MAXWELL, 1987).

Em geral, poucos avanços foram obtidos em relação aos componentes dos diluentes seminais desde a incorporação da gema de ovo ou leite (crioprotetor não penetrante) com glicerol (crioprotetor penetrante) para proteção dos espermatozoides durante a refrigeração e congelamento (DELL VALLE *et al.*, 2013).

Conforme Gil *et al.* (2003), o uso de aditivos de origem animal como gema de ovo e leite na diluição seminal pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto, além de uma subsequente produção de endotoxinas capazes de prejudicar a capacidade de fecundação dos espermatozoides (BITTENCOURT *et al.*, 2008).

A água de coco, produto de origem vegetal, possui características que a classifica como um bom diluente, pois fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade dos gametas masculinos (BLUME; MARQUES JR., 1994). Entretanto é necessária a utilização de um crioprotetor não penetrante e penetrante para obter sucesso na refrigeração e congelamento seminal.

Diante do exposto, tornaram-se necessárias pesquisas por novos crioprotetores que pudessem substituir o uso da gema de ovo e do leite desnatado, formulando um diluente livre de patógenos de origem animal.

Desta forma este trabalho objetiva avaliar o efeito crioprotetor do meio à base de água de coco em pó na conservação de sêmen.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sêmen

Produto da ejaculação normal de um reprodutor, o sêmen é composto por espermatozoides produzidos nos testículos e por uma fração líquida produzida pelas glândulas acessórias do aparelho genital masculino (CORTEEL, 1981), denominada plasma seminal.

O sêmen pode ser processado de diferentes maneiras, podendo ser usado imediatamente após a coleta, puro ou diluído, refrigerado ou congelado. Mesmo empregado puro, o ejaculado que um macho proporciona pode ser utilizado em um número relativamente elevado de fêmeas. Depois de diluído, o sêmen pode ser conservado refrigerado a 4 °C para utilização em um curto período de tempo ou congelado a -196 °C em nitrogênio líquido por um período indeterminado, prolongando assim o seu emprego (NUNES, 1988).

2.2. Avaliações seminais

A avaliação do sêmen é considerada, o método ideal para avaliar a fertilidade do reprodutor, além da sua habilidade de produzir a prenhez (HAFEZ, 1995). Normalmente, a análise do sêmen inclui volume, aspecto, determinação da concentração, motilidade e morfologia espermáticas, rotineiramente realizada por microscopia ótica (VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Segundo Fonseca *et al.* (1991), os ejaculados deverão ser analisados quanto a: volume, aspecto, mediante avaliação visual, podendo ser cremoso, leitoso, opalescente, seroso ou aquoso, dependendo da concentração espermática; cor, normalmente amarelada; e turbilhão ou movimento de massa, sendo o resultado de motilidade, vigor e concentração espermática; motilidade espermática, expressa em percentual; vigor espermático, que representa a força do movimento que influencia a velocidade com que os espermatozoides se

movimentam; concentração espermática; percentual de espermatozoides morfológicamente normais (morfologia); provas de integridade de membrana e teste de termorresistência.

Os critérios de avaliação para o sêmen seguem os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). O sêmen fresco deve apresentar no mínimo motilidade na ordem de 70% (0-100%), vigor 3 (0-5) e 80% de espermatozoides com morfologia normal.

No que diz respeito às avaliações microscópicas, a concentração espermática pode ser determinada com auxílio de espectrofotometria ou de microscopia óptica, utilizando-se a câmara de Neubauer (SANTOS, 2006). Avalia-se, ainda, a presença da motilidade massal, que é o movimento da massa de espermatozoides no plasma seminal (0 – 5) e a motilidade individual progressiva (MIP; 0-5), que representa o movimento em flecha de cada espermatozoide, individualmente (NUNES, 2002; HAFEZ; HAFEZ, 2004). Quanto à avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis e motilidade individual progressiva, o sêmen deve ser diluído, para visualização individualizada dos espermatozoides (CBRA, 1998; CHEMINEAU *et al.*, 1991; EVANS; MAXWELL, 1990).

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

Outro teste para avaliação da integridade da membrana é o teste hiposmótico (HOST), o qual se baseia na observação da membrana espermática íntegra, que, quando exposta a uma solução hiposmótica, permite, por osmose, a passagem de água para o interior da membrana celular até que ocorra o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares, fazendo com que a cauda do espermatozoide enrole, caso este esteja viável (JEYENDRAN *et al.*, 1984).

A análise subjetiva é a técnica convencional utilizada para realizar as análises seminais, entretanto, está sujeita a diferentes graus de imprecisão, devido à subjetividade da avaliação, que é baseada na observação através de microscópio óptico. Sendo a determinação da motilidade e da morfologia especialmente susceptíveis ao erro humano (LLEÓ, 2003). Sistemas de análises computadorizadas têm substituído a avaliação de sêmen por microscopia de luz convencional, uma vez que proporcionam informações mais detalhadas e objetivas sobre várias características da motilidade e da morfometria (VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Vários sistemas de análise computadorizada das células espermáticas (CASA) comerciais, como *Hamilton Thorn* (Hamilton ThornResearch, Bervely, USA); *IMAGESP*[®] (Vimas *IMAGESP*[®], Barcelona, Espanha); *HobsonSpermTracker* (HobsonTracking Systems Ltda., Sheffield, Inglaterra) e *SpermClassAnalyzer*[®] (Microptic SL, Barcelona, Espanha), baseados predominantemente na avaliação individual do espermatozoide, foram validados para uso em ovinos e caprinos.

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 (AMANN; KATZ, 2004). A automatização desta análise permite maior objetividade e rapidez, uma vez que é realizada numa fração menor do tempo requerido pela avaliação subjetiva (MORTIMER, 2000).

Atualmente, esses sistemas estão sendo utilizados, principalmente nos centros andrológicos de reprodução assistida, demonstrando ser uma eficiente, precisa e real ferramenta na avaliação objetiva da fertilidade, por permitir a obtenção de medidas individuais de movimento, contribuindo assim, na melhoria das tecnologias da reprodução, bem como no desenvolvimento de estudos fisiológicos (VERSTEGEN *et al.*, 2002).

2.3. Diluentes seminais

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). Estes diferem em sua composição dependendo

da espécie animal, da origem do sêmen e da tecnologia seminal empregada (HOPKINS; EVANS, 1991).

Um bom diluente deve apresentar ausência de toxicidade à célula espermática, isotonicidade, poder nutritivo e tamponante, ação estabilizadora de membrana, potencial hidrogeniônico (pH) que favoreça a sobrevivência espermática e ainda ser de fácil preparo e baixo custo (FONTBONNE, 1993). Os meios diluentes são utilizadas com o objetivo de proteger as células espermáticas de efeitos deletérios do processo de refrigeração e/ou congelação, visando estabilizar a membrana plasmática (JASKO, 1994).

A maioria dos diluentes apresenta a gema de ovo como componente básico, já que a fosfatidilcolina (lecitina) e as lipoproteínas da gema e a caseína do leite protegem os espermatozoides durante a refrigeração, contra o choque térmico (DAS; RAJKONWAR, 1995; MIES FILHO *et al.*, 1982). Porém, existe um fator a ser considerado, exclusivo do macho caprino, que é o fato das suas glândulas bulbouretrais produzirem, particularmente, uma fosfolipase que hidrolisa a lecitina da gema de ovo, formando ácidos graxos e lisolecitina, esta última atua sobre a membrana espermática danificando-a (ROY, 1957). Em 1982, Nunes e colaboradores, descobriram a existência de uma fração protéica do plasma seminal (BU-III), procedente das glândulas bulbouretrais, que interage com o leite, produzindo inibição da motilidade espermática e induzindo a reação acrossômica. Essa lisolecitina é tóxica devido a sua ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática (NUNES, 1982).

Em síntese, é desejável a utilização de meios diluentes em que a capacidade fecundante dos espermatozoides seja mantida por períodos prolongados (SCHINDLER; AMIR, 1961).

2.4. Meio de conservação seminal à base de água de coco

A água de coco (*Cocos nucifera* L.) é uma solução natural, ácida e estéril, composta de sais, proteínas, carboidratos, vitaminas, gorduras neutras e uma pequena quantidade de fosfolipídios além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos

(MARQUES, 1982; NUNES, 1998). Dessa forma, a água de coco possui características que a classifica como um bom diluente, pois fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade dos gametas masculinos (BLUME; MARQUES JR., 1994).

A água de coco tem sido utilizada na biotecnologia da reprodução animal obtendo-se bons resultados na preservação do sêmen de animais domésticos como caprinos (MELO, 2010; NUNES, 1986; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SALLES, 1989), ovinos (CAVALCANTE, 2008; MACHADO *et al.*, 2006), suínos (BARROS, 2010; TONIOLLI *et al.*, 2010; TONIOLLI; MESQUITA, 1990), felinos (SILVA *et al.*, 2007) e canídeos (CARDOSO *et al.*, 2006; UCHOA *et al.*, 2004; 2010).

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

O ácido 3-indol acético (IAA), uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, foi isolada da fração ativa da água de coco, tendo ação no metabolismo dos espermatozoides (NUNES *et al.*, 1994). A adição de IAA na composição de outros meios diluentes aumentou a taxa de motilidade, fertilidade e tempo de conservação do sêmen de diferentes espécies (NUNES; SALGUEIRO, 1999).

Utilizando a água de coco in natura como diluente para o sêmen caprino, Nunes (1986; 1987; 1988), Freitas (1988) e Salles (1989) realizaram inseminações artificiais com o sêmen refrigerado a 4 °C por até 48 horas. Os autores obtiveram taxas de parição de produtos do sexo feminino de 68, 60 e 63%, respectivamente. Nunes (1986; 1987; 1988) verificou que a proporção sexual, em três anos, de cabras inseminadas com sêmen diluído em água de coco in natura e resfriado a 4 °C foi de 72, 70 e 73%, respectivamente para crias do sexo feminino. Da mesma forma, Salles (1989) obteve uma maior percentagem de fêmeas nascidas (73,8%).

A disponibilidade do fruto com seis meses de maturação (características ideais) e a impossibilidade de armazenamento são algumas das dificuldades encontradas para

utilização da água de coco *in natura* como diluente para sêmen. Dessa forma, Salgueiro *et al.* (2002), com intuito de facilitar a utilização da água de coco como diluente, padronizaram a água de coco na forma de pó, recebendo a denominação de ACP, conservando suas características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se dispõe do fruto.

O ACP já foi utilizado como diluente seminal tanto para caprinos como para ovinos, e após inseminações artificiais foram obtidas taxas de gestação satisfatórias (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2006; SALGUEIRO *et al.*, 2002).

Uchoa *et al.* (2004) ao utilizar ACP-106 (específico para cães) como diluente seminal em inseminações artificiais obtiveram 64,3% de fêmeas nascidas com o uso do de cadelas de várias raças, e de 62,8% para cadelas da raças Bulldog Francês (UCHOA *et al.*, 2010).

Para a criopreservação do sêmen caprino, a formulação ACP-101c foi desenvolvida (pH: 6,68; 342 mOsm/kg H₂O). E para conservação do semen ovino foi desenvolvida a formulação ACP-102 (pH: 7,00; 300 342 mOsm/kg H₂O).

2.5. Crioprotetores

Os crioprotetores são utilizados com a finalidade de reduzir os danos físicos e químicos, resultantes dos processos de refrigeração, congelação e descongelação das células espermáticas (PURDY, 2006). A caseína do leite, as proteínas da gema de ovo e o glicerol são os crioprotetores mais utilizados nos diluentes de sêmen (EVANS; MAXWELL, 1987). Eles podem ser classificados como crioprotetores penetrantes (intracelular) e crioprotetores não penetrantes (extracelular).

Os crioprotetores penetrantes são moléculas pequenas que agem nos meios intracelulares e extracelulares, com a capacidade de atravessar a membrana plasmática e controlar a pressão osmótica intra e extracelular. São responsáveis por uma desidratação celular, tendo como consequência uma menor formação de cristais de gelo interno, culminando com menor dano de membrana espermática pós descongelamento. Os mais comumente utilizados são o glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido e

dimetilformamida (GRAHAM, 1995). Entretanto vale ressaltar que o glicerol é o crioprotetor mais utilizado para conservação do sêmen de caprinos e ovinos (SALAMON; MAXWELL, 2000). Os crioprotetores não penetrantes agem no meio extracelular, auxiliando no transporte de água para o exterior da célula. As substâncias mais utilizadas como crioprotetor não penetrantes são: as proteínas da gema de ovo e do leite desnatado, açúcares, polímeros sintéticos e amidas (GRAHAM, 1995).

O completo entendimento sobre os mecanismos de ação dos crioprotetores tanto penetrantes como os não penetrantes ainda não está completamente elucidado, sendo este assunto, objeto de várias pesquisas (PURDY, 2006).

2.5.1. Gema de ovo

A gema de ovo é um dos crioprotetores não penetrantes mais utilizados mundialmente (RITAR; SALAMON, 1982; TULI; HOLTZ, 1994). Moussa *et al.* (2002) sugerem que sua ação seja devida à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que atuam na membrana plasmática do espermatozoide, restaurando a perda de fosfolípidios e aparentemente induzindo uma alteração transitória de sua composição, consequentemente, prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTAD, 1996).

Recentemente numerosos estudos confirmaram que a utilização do LDL extraído da gema de ovo como crioprotetor obteve sucesso na criopreservação do sêmen de suínos (HU *et al.*, 2006; 2008; JIANG *et al.*, 2007), bovinos (AMIRAT *et al.*, 2004; AMIRAT-BRIAND *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2010) e canídeos (BENCHARIF *et al.*, 2008; VARELA JUNIOR *et al.*, 2009).

Segundo Hu *et al.* (2011), a substituição da gema de ovo pela LDL na composição do meio diluente foi benéfica para criopreservação do sêmen de touros. O meio diluente contendo LDL obteve uma maior proporção de espermatozoides móveis, acrossomas intactos e membranas plasmáticas intactas após o processo de congelamento/descongelamento quando comparados ao meio diluente contendo a gema de ovo.

Apesar dos efeitos benéficos da gema de ovo, as desvantagens dos diluentes que a utilizam são atribuídas à opacidade óptica, causada pelos grânulos formados, que dificultam o exame imediato através da avaliação microscópica, o prejuízo causado à respiração do espermatozoide, a diminuição da motilidade e, ainda, podem transportar microorganismos patogênicos (BOUSSEAU *et al.*, 1998; MARTIN, 2005).

Outro ponto de discussão em relação à gema de ovo é que a qualidade do sêmen congelado/descongelado é influenciada pela qualidade individual inerente a gema de ovo devido ao número de dias após a postura e o período de armazenamento, o que torna difícil a análise em particular do efeito benéfico de um diluente à base de gema de ovo (FUKUI *et al.*, 2008).

A presença da lipoproteína fosfolipase “A” e da fração proteica BU-III no plasma seminal caprino promove uma interação não favorável para o espermatozoide com a gema de ovo e com o leite em pó, respectivamente. A primeira hidrolisa a lecitina da gema em ácidos graxos e lisolecitinas, esse último sendo tóxico para o espermatozoide. A segunda produz inibição da motilidade espermática e induz a reação acrossômica precoce (NUNES *et al.* 2011).

Bispo *et al.* (2011) indicam para criopreservação do sêmen caprino uma baixa porcentagem de gema (2,5%), independente da estação reprodutiva. Já para ovinos a concentração de gema é bastante variada (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Conforme Gil *et al.* (2003), o uso de aditivos de origem animal como gema de ovo e leite na diluição seminal pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto, além de uma subsequente produção de endotoxinas capazes de prejudicar a capacidade de fecundação dos espermatozoides (AIRES *et al.*, 2003).

Diante do exposto, tornaram-se necessárias pesquisas por novos crioprotetores que pudessem substituir o uso da gema de ovo, principalmente para o sêmen caprino.

Uma alternativa que tem sido bastante estudada é o uso da lecitina de soja (AIRES *et al.*, 2003), que por ser um produto de origem vegetal reduziria os riscos de contaminação. Gil *et al.* (2003) comparando a eficácia do uso de lecitina de soja em relação a um diluente convencional, a base de leite-gema de ovo, para a criopreservação do sêmen

ovino verificou índices de fertilidade semelhantes entre as ovelhas inseminadas com o sêmen congelado.

Em um recente estudo com touros, ficou comprovado que a lecitina de soja pode ser uma alternativa à gema de ovo, já que não foram observadas diferenças significativas em relação aos parâmetros espermáticos, quando comparado ao diluente a base de TRIS-gema e ao diluente composto por lecitina de soja (PRADO *et al.*, 2012).

Os diluentes à base de lecitina de soja tem demonstrado resultados consistentes e satisfatórios na qualidade seminal em diferentes protocolos de congelação do sêmen caprino (NORDSTOGA *et al.*, 2011; ROOF *et al.*, 2012; SARIOZKAN *et al.*, 2012).

Roof *et al.*, (2012) concluíram que aparentemente não existem desvantagens em substituir a gema de ovo por diluentes à base de lecitina de soja para criopreservação do sêmen caprino, ressaltando ainda, a característica de ser um produto de origem vegetal livre de patógenos de origem animal.

Del Valle *et al.*, (2013) utilizou óleos vegetais de coco e de palma em substituição a gema de ovo no diluente TRIS para sêmen ovino, e concluiu que apesar de não ter sido demonstrado efeito superior desses óleos na qualidade seminal pós descongelação, são ainda necessárias mais pesquisas sobre assunto.

2.6. Óleo de coco

O óleo de coco é um subproduto da massa do coco, que é classificado como lipídios de estrutura líquida de origem vegetal, que em temperaturas mais elevadas (superior a 25 °C) se apresenta na forma líquida, e tende a se solidificar em temperaturas inferiores a 25 °C (BOMTEMPO, 2008).

O óleo de coco assim como o coco, tem sido uma importante fonte de alimentação para humanidade por milhares de anos. O óleo de coco é rico em ácidos graxos saturados, com mais de 90% em sua composição. Esses ácidos graxos são na sua maioria (60

a 63%) de cadeia média, e principalmente constituídos pelos ácidos láurico (46 a 48%) e mirístico (13 a 19%) (MARINA; CHEMAN; AMIN, 2009).

Atualmente, o óleo de coco extra virgem está com alta notoriedade no meio científico, porque se acredita que ele possui mais benefícios, e que apresenta componentes mais bioativos como a vitamina E e os polifenóis (NEVIN; RAJAMOHAN, 2004).

Vários estudos tem demonstrado que os óleos vegetais afetam a peroxidação lipídica, os parâmetros antioxidantes e levam a mudanças favoráveis no estado lipídico (VISIOLI, *et al.*, 1995). Em um estudo conduzido com ratos, foi demonstrado que a administração alimentar do óleo de coco extravirgem aumentou a atividade enzimática antioxidante e reduziu o teor de peróxido lipídico (ratos).

Andreev *et al.*, (2008) ao avaliarem o efeito de lipídios na formação de cristais de gelos durante a congelação de células espermáticas de Truta, verificaram que eles são capazes de impedir o crescimento dessas estruturas de cristais de gelo, e recomendam a sua utilização como aditivos para melhorar as propriedades crioprotetoras do meio diluente utilizado. Em adição, sugerem que pode ocorrer redução da concentração de outros crioprotetores que são tóxicos para célula, sem comprometer a qualidade da preservação seminal.

Baseado nessas observações feitas anteriormente Del Valle *et al.*, (2013) utilizaram o óleo de coco como crioprotetor para congelação do sêmen ovino, entretanto não foi observado melhoria na qualidade seminal pós descongelação, quando comparada ao diluente à base de gema de ovo. Esses autores foram os precursores para a tendência mundial de busca por novos crioprotetores para diluentes seminais que possam vir a substituir a gema de ovo, que por ser um produto de origem animal, carrega consigo grande risco de transmissão de patógenos.

2.7. Conservação seminal

Os protocolos de resfrigeração e/ou congelação de sêmen, através da utilização de diluentes, visam prevenir lesões na membrana celular e a formação de gelo intracelular,

pois a utilização do frio para a preservação seminal pode promover alterações na estrutura e funcionalidade celular (CORCINI, 2007), podendo provocar prejuízos na motilidade e morfologia espermáticas (HOLT, 2000).

Para a conservação das células espermáticas de caprinos e de ovinos são utilizadas duas técnicas básicas: a refrigeração e a congelação (NUNES, 2010; SALAMON; MAXWELL, 2000). O sêmen criopreservado pode ser guardado por longos períodos em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, tendo este uma maior aplicabilidade, já que os reprodutores caprinos em determinadas regiões podem apresentar estacionalidade reprodutiva, em consequência do fotoperíodo (TRALDI, 2006).

2.8. Refrigeração

A refrigeração do sêmen tem por finalidade prolongar a capacidade fertilizante dos espermatozoides através da redução ou parada de sua motilidade e de suas reações metabólicas (MAXWELL; EVANS, 1990). O sêmen caprino e ovino podem ser mantidos refrigerados em temperaturas variando de 2 a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, mas principalmente entre 4 a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, com conservação da qualidade seminal por até 24 horas (LEBOEUF *et al.*, 2000; PURDY, 2006).

A queda de temperatura entre 19 e $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ é o período em que ocorre a maioria das alterações morfológicas e funcionais do espermatozoide, devido à mudanças irreversíveis na atividade metabólica da membrana do espermatozoide, levando à ruptura e perda de componentes celulares (GRAHAM, 1996).

A refrigeração do sêmen pode causar danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais à membrana plasmática do espermatozoide, resultando em uma redução da motilidade, viabilidade e consequentemente da fertilidade (IRITANI; NISHIKAWA, 1961; ROY, 1957). O conjunto destes danos causados aos espermatozoides é denominado de “choque térmico” (WATSON, 2000).

Uma das principais medidas para evitar o choque térmico é a refrigeração gradual do sêmen, juntamente com a adição de fosfolípidios ao diluente (SALAMON; MAXWELL, 2000). A gema de ovo, que é uma fonte lipídica, não é utilizada apenas para

proteção contra o choque térmico, mas também para prevenir danos acrossomais que ocorrem devido ao choque térmico (MEDEIROS *et al.*, 2002).

A motilidade dos espermatozoides pode ser mantida por vários dias a 5 °C, porém, o sêmen declina em um ritmo de 10-35% por dia de armazenamento. O período máximo de conservação, para se obter um nível aceitável de fertilidade para inseminação artificial é de 48 horas para caprinos, considerando que a inseminação artificial dessa espécie pode ser realizada de forma mais profunda (EVANS; MAXWELL, 1987).

2.9. Congelação

O processo de congelação de sêmen, além de possibilitar sua utilização por períodos mais longos reduz custos com a aquisição e transporte de reprodutores, e favorece a rápida difusão de material genético entre regiões, países e continentes (CASTELO *et al.*, 2008).

As lesões ocasionadas pela congelação são atribuídas às mudanças de temperatura, à formação de cristais de gelo, aos danos oxidativos, às alterações da membrana do espermatozoide, à toxicidade dos crioprotetores utilizados e ao estresse oxidativo (WATSON, 2000).

Assim como o sêmen caprino, o sêmen ovino pode ser armazenado em palhetas francesas de 0,25 ml ou 0,5 ml ou na forma de peletes (MAXWELL; EVANS, 1990). Bezerra *et al.* (2009) avaliaram a influência do volume das palhetas de 0,25 ml e 0,5 ml sobre a qualidade do sêmen caprino descongelado e concluíram que o envase nesta última promove maiores resultados de motilidade progressiva após a descongelação. Ritar *et al.* (1990) descreveram que o armazenamento do sêmen caprino congelado na forma de peletes obteve resultados superiores na motilidade progressiva pós-descongelação quando comparada ao armazenamento em palhetas francesas.

A congelação propriamente dita pode ser feita utilizando uma máquina de congelação automática ou, como é mais comumente utilizado, através de rampa em vapores de nitrogênio líquido. Segundo Evans e Maxwell (1987), as palhetas devem ser dispostas em

uma rampa posicionada a 3-4 cm do vapor de nitrogênio líquido com duração de 7-8 minutos e, em seguida, mergulhadas no nitrogênio líquido para armazenamento. Em contrapartida Leboeuf *et al.* (2000) recomendam que as palhetas sejam dispostas horizontalmente a 4-5 cm dos vapores de nitrogênio líquido por 4-5 minutos e, em seguida, mergulhadas no nitrogênio líquido.

A descongelação das amostras de sêmen é determinada pelo método de armazenamento utilizado. Peletes devem ser descongelados em um tubo seco a 37 °C, enquanto que a descongelação das palhetas pode ser realizada por diversas metodologias. Tradicionalmente, as palhetas são descongeladas em banho Maria a 37 °C durante 12 a 30 segundos (PURDY, 2006).

3. JUSTIFICATIVA

Existem diversos meios de conservação para o sêmen de mamíferos e em quase sua totalidade possuem em sua composição substâncias de origem animal, como a gema de ovo ou o leite desnatado, o que implica em risco biológico potencial, comprometendo o comércio internacional de doses de sêmen, e como consequência maior a difusão de material genético de alto valor. Desta forma, o presente estudo justifica-se pela necessidade mundial do desenvolvimento de meios de conservação seminal que sejam livres de produtos de origem animal.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

O meio de criopreservação seminal à base de água de coco em pó (ACP-101c), adicionado de óleo de coco extravirgem, será capaz de conservar a qualidade seminal caprina pós descongelação.

O meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102) sem a adição de produtos de origem animal será capaz de conservar a qualidade do sêmen ovino armazenado a 5 °C por 24 horas.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP) sem a adição de produtos de origem animal na conservação do sêmen de caprinos e ovinos

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a concentração ideal de óleo de coco extravirgem a ser adicionada ao meio de criopreservação à base de água de coco em pó (ACP-101c) do sêmen caprino;
- Avaliar os parâmetros cinéticos espermáticos após a diluição no meio de congelação à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de óleo de coco extravirgem (0h) e na pós descongelação através do Sistema de Análise de Sêmen Computadorizada (SCA[®], versão 5.0, Microptics S.L.,Barcelona, Espanha);
- Determinar a necessidade da adição do crioprotetor gema de ovo ao meio de conservação a base de água de coco em pó (ACP-102[®]) ao sêmen ovino refrigerado a 5 °C e armazenado por 24 horas;
- Avaliar e comparar o efeito dos diluentes: Tris adicionado de 15% de gema de ovo, ACP-102[®] adicionado de 15% de gema de ovo e ACP-102[®] sobre os parâmetros cinéticos do sêmen ovino refrigerado a 5 °C e armazenado por 24 horas, através do Sistema de Análise de Sêmen Computadorizada (SCA[®], versão 5.0, Microptics S.L.,Barcelona, Espanha);
- Avaliar a viabilidade espermática através da técnica de coloração com eosina-nigrosina no sêmen ovino diluído em diferentes meios de conservação (Tris adicionado de 15% de gema de ovo, ACP-102[®] adicionado de 15% de gema de ovo e ACP-102[®]), em diferentes tempos de conservação a 5° C;

- Determinar se o tempo de conservação a 5 °C (0, 6 e 24 horas) influenciará na qualidade do sêmen ovino.

6. CAPÍTULO 1

Processo de criopreservação de sêmen de mamíferos e diluente de sêmen com produtos de origem vegetal

Cryopreservation of mammals sperm and sperm extenders with products of vegetal origin

Patente depositada no Núcleo de Inovação Tecnológica da Universidade Estadual do Ceará (Submissão em Maio de 2013).

Resumo

Na criopreservação seminal é necessária a utilização de diluentes que forneçam nutrientes e protejam as células espermáticas contra o choque térmico. É comum o uso de aditivos de origem animal aos diluentes, o que implica em riscos sanitários. Desta forma este trabalho objetivou desenvolver um meio de conservação seminal para caprinos livre de substâncias de origem animal à base de água de coco adicionada de óleo de coco extravirgem. Os ejaculados de quatro reprodutores caprinos foram diluídos no meio de criopreservação à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionada de óleo de coco extravirgem (OC) e glicerol (GLI), constituindo-se nos tratamentos T1 (ACP-101c + 2,5% OC + 7% GLI) e T2 (ACP-101c + 4% OC + 7% GLI). Em seguida foram envasados em palhetas francesas de 0,25 ml, refrigerado até atingir a temperatura de 4 °C e em seguida congelado em vapores de nitrogênio líquido (-60 °C). Imediatamente após a diluição do sêmen fresco e após a descongelação das palhetas a 37 °C por 30 segundos, as amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos: motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), total de espermatozoides rápidos (ER%), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade média do percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$) através do software *Sperm Class Analyser* (SCA[®], versão 5.0, Microptics S.L., Barcelona, Espanha). Em todos os parâmetros cinéticos analisados: motilidade total, motilidade progressiva, percentual de espermatozoides rápidos, velocidade curvilínea, velocidade linear e velocidade média do percurso o tratamento T2 obteve resultados superiores aos observados no T1. De acordo com resultado, conclui-se que o meio de criopreservação à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de óleo de coco extravirgem é eficaz para criopreservação do sêmen caprino. Entretanto, são necessários novos estudos para melhorar a eficiência do processo de criopreservação com este novo diluente, livre de substâncias de origem animal.

Palavras-chave: Criopreservação. Água de coco em pó. Óleo de coco extravirgem. Sêmen.

Abstract

In sperm cryopreservation is necessary to use extenders that provide nutrients and protect sperm cells against cold shock. It is common in extenders to use additives of animal source, which involves health risks. Therefore, this work aimed to develop a sperm conservation medium for goats free of animal substances based on powdered coconut water added with extra virgin coconut oil. The four bucks ejaculates were diluted in the medium based on powdered coconut water (ACP-101c) added with extra virgin coconut oil (CO) and glycerol (GLY), consisting in the treatments T1 (ACP-101c + 2.5% CO + 7% GLY) and T2 (ACP-101c + 4% CO + 7% GLY). Then we filled into 0.25 ml straws, cooled to the temperature of 4 °C and then frozen in liquid nitrogen vapor (-60 °C). Immediately after dilution of fresh sperm and after thawing straws at 37 °C for 30 seconds, the samples were evaluated for kinetic parameters: total motility (MT%), progressive motility (PM%), total fast sperm (ER%), curvilinear velocity (VCL, μm), linear velocity (VSL, μm) and average speed of the path (VAP, μm) through the software *Sperm Class Analyser* (SCA[®], version 5.0, Microptics SL, Barcelona, Spain). In all kinetic parameters the treatment T2 obtained results superior to those observed in T1. According to the result, it is concluded that the medium based on powdered coconut water (ACP-101c) added extra virgin coconut oil is effective for cryopreservation of goat sperm. However, further studies are needed to improve the efficiency of cryopreservation with the new extenders, free of substances of animal origin.

Keywords: Cryopreservation. Water coconut powder. Extravirgem coconut oil. Goat sêmen

Introdução

Na criopreservação seminal é necessário à utilização de um diluente que forneça energia, proteja as células contra danos relacionados a baixas temperaturas e mantenha um ambiente adequado para a sobrevivência espermática (EVANS; MAXWELL, 1987).

A maioria dos diluentes seminais de mamíferos possuem em sua composição gema de ovo que atua como crioprotetor não penetrante da membrana espermática (TULI; HOLTZ, 1994), entretanto torna-se difícil o preparo uniforme do diluente devido a grande variação individual existente em cada gema de ovo (FUKUI *et al.*, 2008). Associado a isso, o uso de aditivos de origem animal como a gema de ovo e o leite na diluição seminal pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto (GIL *et al.*, 2003) além de uma subsequente produção de endotoxinas capazes de prejudicar a capacidade de fecundação dos espermatozoides (BITTENCOURT *et al.*, 2008).

Desta forma, este trabalho objetivou-se por avaliar o efeito crioprotetor do diluente livre de produtos de origem animal, a base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de óleo de coco extravirgem, na congelação do sêmen caprino.

Material e métodos

Local do experimento

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

Preparação dos diluentes

O meio de criopreservação à base de água de coco em pó (ACP-101c) específico para caprinos (ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará; pH 6,92; 300 mOsm/Kg H₂O; PL = 3,19 g), diluído em 50 ml de água destilada e acrescido de 40 mg de gentamicina. Ao meio ACP-101c foram ainda acrescidos crioprotetores: T1 (ACP-101c + 2,5% óleo de coco extravirgem + 7% glicerol); e T2 (ACP-101c + 4% óleo de coco extravirgem + 7% glicerol). Para determinação das concentrações de óleo de coco utilizadas nesse estudo, foram realizados experimentos

pilotos com várias concentrações distintas (1, 2,5, 4,0 e 7,0%), sendo as concentrações de 2,5 e 4,0% as que demonstraram melhor atividade crioprotetora.

Animais

Foram utilizados quatro bodes da raça Saanen. Os animais foram mantidos em baias individuais, em manejo intensivo, com alimentação constituída de feno de Tifton (*Cynodon dactylum*) e ração comercial com 18% PB, ficando os animais com água e sal mineral à vontade. O arrazoamento dos animais era dividido em duas partes, sendo metade da oferta de feno e ração comercial disposto durante a manhã e a outra metade no período final da tarde.

Coleta e avaliação do sêmen pré-diluição

As amostras de sêmen foram coletadas com o auxílio de uma vagina artificial adequada à espécie, em presença de uma fêmea caprina. Após a coleta, as amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria a 32 °C e avaliados quanto ao volume (ml) e motilidade massal (0 a 5) (CBRA, 1998). Somente ejaculados com volume superior a 0,5 ml e motilidade massal ≥ 3 foram utilizados para o experimento. Em seguida, a concentração espermática de cada ejaculado ($\times 10^9$ spz/ml) foi determinada em câmara de Neubauer (CHEMINEAU *et al.*, 1991).

Congelação seminal

Os ejaculados foram reunidos em um *pool*, divididos em duas alíquotas de igual volume e diluídos a 32 °C em dois tratamentos: T1 e T2 em tubo tipo *falcon* de 15 ml obtendo uma concentração final de 400×10^6 spz/ml. Em seguida o sêmen diluído foi envasado em palhetas francesas de 0,25 ml (contendo cada uma 100×10^6 spz), e refrigeradas a 4 °C em 120 minutos, com uma velocidade média de refrigeração de 0,25 °C/minuto. Após a refrigeração seminal, as palhetas foram colocadas em rampa de congelação a 3,5cm do vapor de nitrogênio líquido (-60 °C), onde foram congeladas durante o período de 10 minutos, sendo em seguida imersas em nitrogênio líquido, acondicionadas em *racks* e armazenadas em botijões criogênicos.

Análise computadorizada da motilidade espermática (CASA)

A análise computadorizada da motilidade espermática foi realizada tanto no sêmen fresco diluído (0 h), imediatamente após a diluição, como nas amostras de sêmen

descongeladas. As palhetas foram descongeladas por 30 segundos no banho Maria a 37 °C. Alíquotas de 100 microlitros do sêmen fresco diluído e 250 microlitros do sêmen descongelado foram acondicionadas em tubos do tipo Eppendorf® e avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos espermáticos após cinco minutos de incubação a 37 °C, através da análise computadorizada do sêmen utilizando o *software* SCA® (Sperm-Class Analyzer, Microptic S.L., versão 5.0, Barcelona, Espanha). Para a análise no SCA®, as amostras foram rediluídas em ACP-101c de forma a se obter uma concentração espermática final em média de 40×10^6 spz/ml, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Alíquotas de 10 µl de cada amostra foram analisadas individualmente em Câmara de Makler pré-aquecida a 37 °C. Foram utilizados os seguintes parâmetros do programa: velocidade limite para espermatozoides lentos: 30µm/s; limite para velocidade média: 60 µm/s; retilinearidade mínima para espermatozoides progressivos: 80%, capturados em três campos. Um mínimo de 200 espermatozoides, por amostra foi avaliado pelo sistema CASA usando microscópio de contraste de fase, com objetiva de 10x.

Os parâmetros avaliados foram: motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), total de espermatozoides rápidos (ER%), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade linear (VSL, µm/s) e velocidade média do percurso (VAP, µm/s).

Resultados

Na figura 1, 2, 3 e 4 é possível observar os parâmetros cinéticos espermáticos do tratamento 1 (T1) e tratamento 2 (T2) em diferentes avaliações. O T2 (Fig.2 e Fig.4) apresenta maior motilidade total (69,7% e 75% respectivamente) quando comparada numericamente a motilidade total (42,9% e 58%) do T1 (Fig.1 e Fig.3). Em relação à motilidade progressiva, também foi observado a mesma relação, o T2 numericamente superior ao T1.

Figura1. Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de 2,5% de óleo de coco extravirgem e de 7% de glicerol (1ª avaliação).

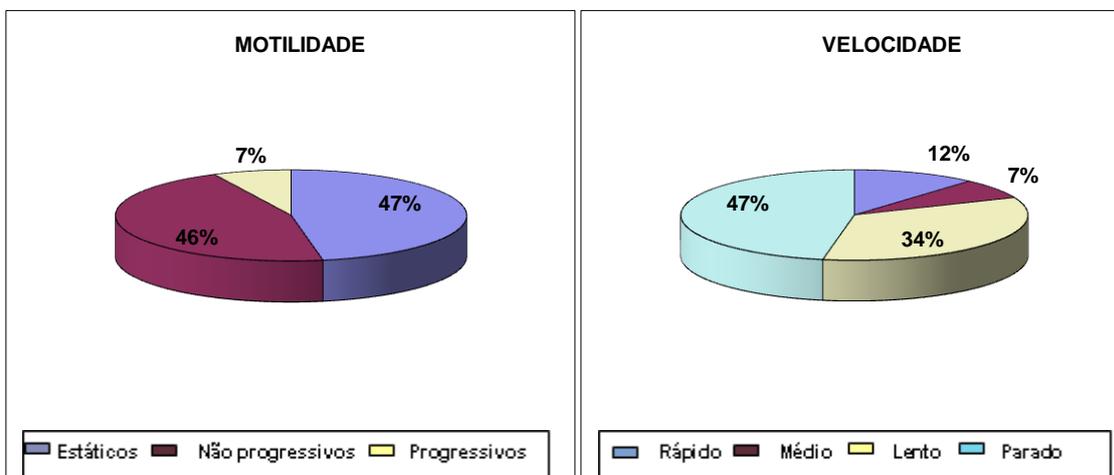


Figura2. Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de 4% de óleo de coco extravirgem e de 7% de glicerol (1ª avaliação).

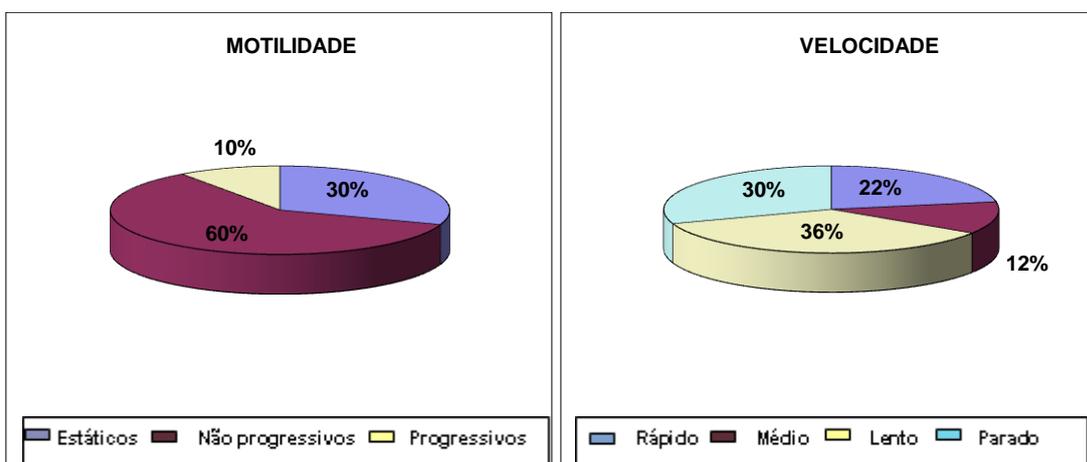


Figura.3. Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de 2,5% de óleo de coco extravirgem e de 7% de glicerol (2ª avaliação).

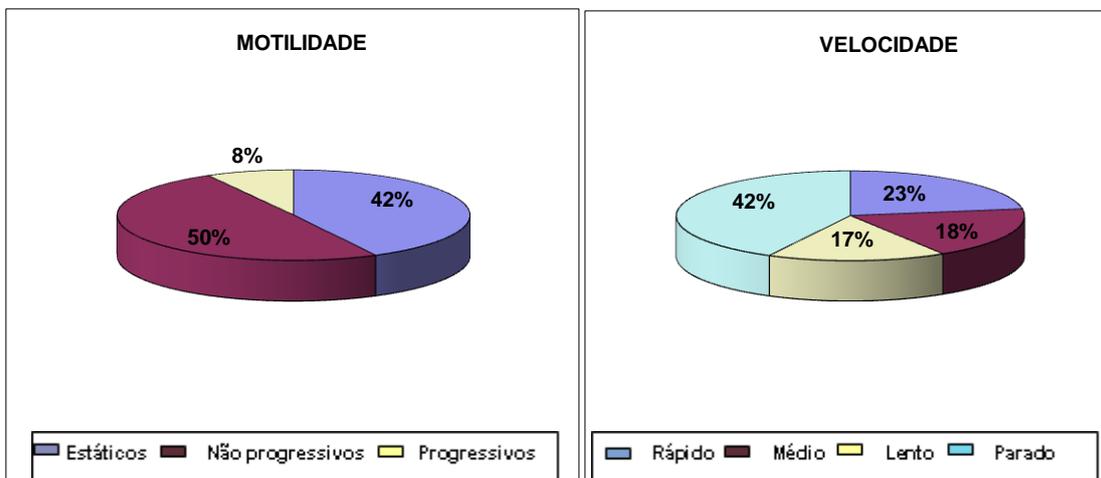
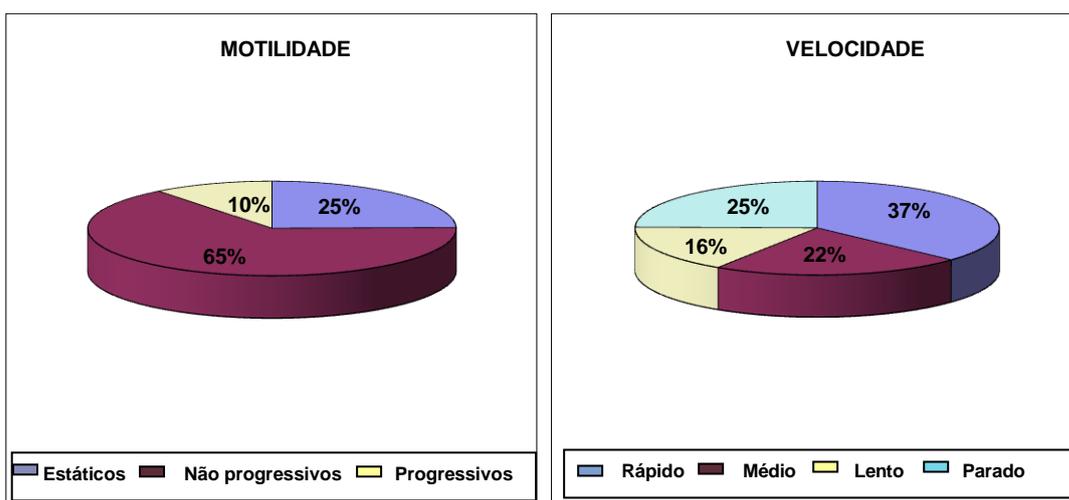


Figura4. Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de 4% de óleo de coco extravirgem e de 7% de glicerol (2ª avaliação).



Na tabela 1 estão descritos os demais parâmetros cinéticos: percentual de espermatozoides rápidos, velocidade curvilinear, velocidade linear e velocidade média do percurso que também obtiveram dados numéricos superiores no tratamento no T2.

Tabela1. Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de óleo de coco extravirgem (T1 (ACP-101c + 2,5% óleo de coco extravirgem + 7% glicerol); e T2 (ACP-101c + 4% óleo de coco extravirgem + 7% glicerol).

TRATAMENTO	%ER	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
T1	17,05%	63,5	21,15	34,15
T2	29,55%	74,7	24,4	40,9

Discussão

A criopreservação do sêmen de caprinos é de fundamental importância, pois além de promover um melhoramento genético, esta possibilita a preservação do material genético, podendo até ser criado um banco de sêmen, com amostras de animais que estão em processo de extinção e de animais que possuem um alto valor comercial e genético.

A linha de pesquisa em busca do desenvolvimento de um novo diluente que não contenha gema de ovo é recente e tem obtido resultados variáveis (DEL VALLE *et al.*, 2013; MATSUOKA *et al.*, 2006). E esta é impulsionada pela tendência mundial de diminuir a utilização de produtos de origem animal em biotecnologias, visando um menor risco biológico.

Del Valle *et al.*, (2013) ao utilizarem 5% de óleo de coco adicionado ao diluente de sêmen ovino à base de TRIS e 5% de glicerol, observaram que a adição do óleo ao diluente não alterou os dados de motilidade espermática pós descongelação quando comparado ao diluente à base TRIS adicionado de 5% de glicerol. Entretanto, ao adicionarem o óleo de coco ao meio de *swim up* modificado para ovinos, foi observado que houve um aumento significativo da motilidade espermática pós descongelação quando comparado ao controle (meio *swim up* padrão).

No presente estudo, obtivemos resultados melhores de motilidade espermática pós descongelação, ao utilizarmos o óleo de coco na concentração de 4%. Concentração essa inferior a utilizada por Del Valle *et al.*, (2013). Mas vale ressaltar que a fisiologia espermática de caprinos e ovinos é diferente, o que pode explicar a diferença dos nossos resultados em relação ao deles.

Foram realizados ensaios prévios (não documentados) sobre a metodologia de congelamento do sêmen caprino, com a utilização do óleo de coco extravirgem, e a maior dificuldade observada é que este em temperaturas abaixo de 28 °C já se solidifica, impossibilitando a diluição em duas etapas (glicerolização a 4 °C), sendo esta toda realizada no início da refrigeração (32 °C). Este fato também foi relatado por Del Valle *et al.*, (2013).

Diante disso, acreditamos que tal fato resultou em um choque hiperosmótico, com consequente enrolamento das caudas dos espermatozoides, o que se refletiu negativamente nos valores de motilidade progressiva e velocidade linear.

Roof *et al.*, (2012) compararam o efeito crioprotetor da lecitina de soja e da gema de ovo, na criopreservação do sêmen de caprinos, e obtiveram como resultados um percentual de motilidade total de 49% e de 19% respectivamente. Ao se comparar esses dados, com os obtidos no estudo atual, verificou-se que tanto a utilização de 2,5% como de 4% obteve resultados superiores de motilidade total. Entretanto estes resultados de motilidade total pós descongelamento, estão de acordo com obtidos anteriores (ABOAGLA; TERADA, 2004; BISPO *et al.*, 2011; DORADO *et al.*, 2007).

No trabalho executado, não houve comparação direta da qualidade seminal pós descongelamento, com diluentes adicionados de gema de ovo, porque, como trabalho inicial queríamos demonstrar a capacidade de crioproteção existente no diluente à base de água de coco em pó adicionado de óleo de coco extravirgem.

Os dados resultantes desta pesquisa demonstram a capacidade crioprotetora do óleo de coco extravirgem. Acredita-se que a ação crioprotetora pode ocorrer de duas maneiras: através da diminuição do ponto de congelamento, devido à formação de uma emulsão de óleo em água, com consequente redução na formação de cristais de gelo (danosos à membrana dos espermatozoides), e pelo fato do óleo de coco extravirgem ser rico em ácidos graxos, os quais promoveriam maior proteção à membrana espermática durante o processo de refrigeração.

Esse estudo teve grande importância na biotecnologia da conservação seminal, pois o resultado de motilidade total pós descongelamento superior a 50% sem a adição de produtos de origem animal é inédito e tem como consequência uma nova linha de pesquisa bastante promissora.

Contudo, mais pesquisas são necessárias para elucidar bioquimicamente o mecanismo pelo qual o óleo de coco protege as células espermáticas e ainda aprimorar a metodologia de criopreservação para espécie caprina utilizando o meio de conservação à base de água de coco em pó adicionado de óleo de coco extravirgem.

Conclusão

De acordo com os parâmetros seminais obtidos pós descongelamento, conclui-se que o meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de 4% de óleo de coco extravirgem, pode ser utilizado como meio de criopreservação seminal para

espermatozoides de caprinos, sendo uma alternativa aos diluentes existentes no mercado que possuem em sua composição produtos de origem animal, conferindo desta forma, maior biossegurança aos processos de conservação de material genético masculino.

Referências bibliográficas

ABOAGLA, E.M.E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1160 –1172, 2004.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins, 1993, p.121-170.

BISPO, C.A.S.; PUGLIESI, G.; GALVÃO, P.; RODRIGUES, M.T.; KER, P.G.; FILGUEIRAS, B.; CARVALHO, G.R. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. **Small Ruminant Research**, vol.100, p. 54-58, 2011

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

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.

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, 1991, 223p.

DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v.68, p.168 –77, 2007.

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

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Butterworth, London, 1987, 194p.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender (AndromedR) in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, P.286-289, 2008.

GIL J.L., NIELS S.L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, p. 1241-1255, 2003.

IBGE/IPECE, Perfil básico municipal, 2009. Governo do Estado do Ceará. Disponível em <<http://www.ipece.ce.gov.br/>>, Data de acesso: Maio de 2013

MATSUOKA, T.; IMAI, H.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 5, p. 675-683, 2006.

ROOF, D.J.; BOWLEY, S.; PRICE, L.L.; MATSAS, D.J. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. **Theriogenology**, v.77, p.412-420, 2012.

TULI, R.K.; W. HOLTZ,. Effect of glycerilization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.4, p.547-555, 1994.

7. CAPÍTULO 2

Efeito de diferentes diluentes na viabilidade espermática do sêmen ovino armazenado a 5 °C

Effect of different extenders on sperm viability of ram semen storage a 5 °C

Periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences) (Submissão em Julho de 2013).

1 Efeito de diferentes diluentes na viabilidade espermática do sêmen ovino armazenado a 5 °C

2 *Effect of different extenders on sperm viability of ram semen storage a 5 °C*

3 Bárbara Mara Bandeira Santos¹, Bruna Farias Brito¹, Lívia Perreira Antunes¹, Leonardo
4 Alves Cabral¹, Talita Soares Câmara¹, Ana Gláudia Vasconcelos Catunda², Cristiane
5 Clemente de Mello Sagueiro³, José Ferreira Nunes^{1*}

6 ¹Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil

7 ² Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Fortaleza, Ceará, Brasil

8 ³ Universidade Potiguar, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil

9 *ferreiranunes@pq.cnpq.br

10 Resumo

11 A água de coco em pó tem sido utilizada com sucesso na conservação de sêmen de diversas
12 espécies. Entretanto não existem dados na literatura sobre sua utilização como diluente para
13 refrigeração do sêmen ovino. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes
14 diluentes (TRIS + 15% gema de ovo; ACP-102[®] + 15% gema de ovo e ACP-102[®] sem gema
15 de ovo) na qualidade do sêmen ovino refrigerado e conservado a 5 °C por 24 horas. O
16 ejaculado de 4 carneiros foram reunidos em um *pool* e em seguida diluído nos seguintes
17 tratamentos : D1 = TRIS + 15% gema de ovo; D2 = ACP-102[®] + 15% gema de ovo e D3 =
18 ACP-102[®] sem gema de ovo. Após a diluição as amostras foram refrigerados a 5 °C e
19 conservados nessa temperatura até 24 horas. Os parâmetros cinéticos espermáticos foram
20 avaliados através do software *Sperm Class Analyser* (SCA[®], versão 5.0, Microptics S.L.,
21 Barcelona, Espanha) nos tempos de 0, 6 e 24 horas de resfriamento. A viabilidade espermática
22 foi avaliada nos diferentes tempos de conservação através da técnica de coloração eosina-
23 nigrosina. O diluente ACP-102[®] adicionado ou não de gema de ovo foi significativamente
24 superior ao diluente TRIS, nos parâmetros de motilidade progressiva e linearidade na
25 conservação do sêmen ovino por 24 horas. O diluente ACP-102[®] adicionado ou não de gema
26 de ovo é capaz de manter a qualidade do sêmen ovino refrigerado a 5° C e armazenado por até
27 24 horas, sendo indicado como alternativa ao diluente comercial TRIS.

28 Palavras-chave: ACP. Ovino. Sêmen. Conservação

29 Abstract

30 The powdered coconut water has been used successfully in the preservation of sperm from
31 different species. However there are no published data on its use as a extender for cooling ram
32 sperm. The aim of this study was to evaluate the effect of different extenders (TRIS + 15%
33 egg yolk; ACP-102[®] + 15% egg yolk and ACP-102[®] without egg yolk) on the quality of ram

34 sperm cooled and stored at 5 ° C for 24 hours . The ejaculate of 4 ram were pooled and then
35 diluted in the following treatments: D1 = TRIS + 15% egg yolk; D2 = ACP-102[®] + 15% egg
36 yolk and D3 = ACP-102[®] without egg yolk. After dilution, the sperm were chilled to 5 ° C
37 and kept at that temperature for up to 24 hours. The sperm kinetic parameters were evaluated
38 by software Sperm Class Analyser (SCA[®], version 5.0, Microoptics SL, Barcelona, Spain) at
39 times 0, 6 and 24 hours of cooling. The sperm viability was evaluated at different storage
40 times by the technique of eosin-nigrosin staining. The extender ACP-102[®] added or without
41 the addition of egg yolk has significantly higher sperm motility and linearity parameters than
42 the extender TRIS in ram sperm preservation for 24 hours. The extender ACP-102[®] added or
43 without the addition of egg yolk is able to maintain the quality of ram semen cooled at 5 ° C
44 and stored for up to 24 hours and is indicated as an alternative to commercial extender TRIS.

45 Keywords: ACP, Ram. Sperm conservation

46

47 Introdução

48 Para inseminação artificial de ovinos é recomendado o uso de sêmen diluído e refrigerado ou
49 criopreservado. O sêmen diluído e refrigerado é uma alternativa ao sêmen criopreservado
50 quando a inseminação artificial for realizada em um curto período de tempo após a coleta do
51 sêmen, e apresenta como vantagem, uma maior viabilidade e motilidade espermática (Gil *et*
52 *al.*, 2003; Gundongan *et al.*, 2010).

53 O sêmen ovino diluído pode ser mantido a 5 °C por até 48 horas, entretanto a qualidade
54 seminal diminui com o decorrer do tempo de armazenamento (Maxwell e Salamon, 1993).

55 Na conservação do sêmen ovino, diferentes diluentes têm sido utilizados com intuito de
56 proteger as membranas espermáticas, e conseqüentemente manter a viabilidade. Atualmente o
57 diluente seminal TRIS adicionado de gema de ovo é o mais empregado na ovinocultura
58 (Saloman e Maxeweell 2000).

59 A água de coco em pó tem sido utilizada com sucesso como diluente seminal na reprodução
60 de caprinos (Oliveira *et al.*, 2009), suínos (Toniolli *et al.*, 2010), caninos (Uchoa *et al.*, 2010).

61 Machado *et al.*,(2006) inseminou ovelhas com sêmen diluído em ACP-102[®] e obteve
62 resultados satisfatórios com a inseminação artificial por laparoscopia. Entretanto existem
63 poucos relatos sobre a qualidade do sêmen ovino conservado em meio à base de água de coco
64 em pó (ACP-102[®]), refrigerado e armazenado a 5 °C. Portanto, o objetivo desse trabalho foi
65 avaliar o efeito de diferentes diluentes (TRIS + 15% gema de ovo; ACP-102[®] + 15% gema de
66 ovo e ACP-102[®]) na qualidade do sêmen ovino refrigerado e conservado a 5 °C por 24 horas.

67 Material e Métodos

68 O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da
69 Universidade Estadual do Ceará, no município de Fortaleza, Ceará, Brasil, com latitude de
70 3°43'47'' sul e longitude de 38°30'37'' oeste, com médias térmicas que variam entre 26 a
71 27°C.

72 Os meios de conservação seminal avaliados foram o ACP-102[®] (pH 7,0; 434 mOsm/Kg H₂O)
73 e TRIS (3,786 g de TRIS, 2,11 g de ácido cítrico, 1,0 g de frutose; pH 6,8; 302 mOsm/Kg
74 H₂O). Estes foram acrescidos de 15% de gema de ovo, sendo obtidos os seguintes diluentes:
75 T1 = TRIS + 15% gema de ovo; T2 = ACP-102[®] + 15% gema de ovo e T3 = ACP-102[®] sem
76 gema de ovo.

77 Para coleta de sêmen foram utilizados quatro carneiros (2 da raça Dorper e 2 da raça Santa
78 Inês). Os animais foram mantidos em confinamento, em baias individuais. A alimentação
79 consistiu de feno de tifton (*Cynodon sp.*) e ração comercial com 18% PB, sal mineral e água à
80 vontade. As amostras de sêmen foram coletadas com o auxílio de uma vagina artificial
81 adequada à espécie, em presença de uma fêmea ovina. Foram obtidos 6 ejaculados por animal,
82 totalizando 24 ejaculados. Imediatamente após a coleta, os ejaculados foram reunidos em um
83 *pool*, que por sua vez foi dividido em três alíquotas iguais e imediatamente diluído nos
84 seguintes tratamentos: T1, T2 e T3 em tubos de ensaio de vidro obtendo uma concentração
85 final de 400×10^6 spz/ ml. Imediatamente após a diluição, as amostras de sêmen diluídas
86 foram refrigeradas a 5 °C no tempo médio de 120 minutos, com uma média de decréscimo de
87 0,25 °C/min e em seguida armazenadas em geladeira com temperatura estabilizada entre 4 a 5
88 °C durante 24 horas.

89 Para análise dos parâmetros cinéticos, amostras de 500 µL de cada tratamento foram
90 analisadas à zero (sêmen fresco diluído), 6 e 24 horas de conservação a 5 °C após cinco
91 minutos de incubação, a 37 °, por meio da análise computadorizada do sêmen utilizando o
92 *software* SCA[®] (Sperm-Class Analyzer, Microptic S.L., versão 5.0, Barcelona, Espanha). Para
93 a análise no SCA[®], as amostras foram rediluídas utilizando-se o mesmo meio de conservação
94 seminal (de cada tratamento), de forma a se obter uma concentração espermática final em
95 média de 40×10^6 spz/mL, para assegurar a confiabilidade dos resultados. Alíquotas de 10 µL
96 de cada amostra foram analisadas individualmente em Câmara de *Makler* pré-aquecidas a 37
97 °C. Foram utilizados os seguintes parâmetros do programa: velocidade limite para
98 espermatozoides lentos: 30µm/s; limite para velocidade média: 60 µm/s; retilinearidade
99 mínima para espermatozoides progressivos: 80%, capturados em três campos. Um mínimo de

100 200 espermatozoides, por amostra foi avaliado pelo sistema SCA[®] usando microscópio de
101 contraste de fase, com objetiva de 10x.

102 Os parâmetros avaliados foram: motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), total
103 de espermatozóides rápidos (ER%), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear
104 (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade média do percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %),
105 retilinearidade (STR - %), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm) e frequência de
106 batimento cruzado (BCF - Hz).

107 A viabilidade espermática foi realizada tanto no sêmen fresco diluído (0h), como nas amostras
108 de sêmen refrigeradas. Para esta análise, foi realizado esfregaço em uma lâmina pré-aquecida
109 a 37 °C utilizando 5 μl do corante eosina-nigrosina (eosina 1g, nigrosina 2g, citrato de sódio
110 3,57g e água destilada qsp. 100 ml - Baril *et al.*, 1993), adicionado a 5 μl do sêmen rediluído.
111 Um total de 200 espermatozoides foi avaliado, sendo identificados como corados (inviáveis)
112 ou não corados (viáveis).

113 O experimento obedeceu a um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x3
114 (três tratamentos e três tempos de conservação). Os dados obtidos foram submetidos à análise
115 de variância, para testar os efeitos dos tratamentos e dos tempos de conservação, bem como,
116 da ocorrência de interação entre os efeitos estudados. Os resultados foram expressos em
117 médias e erros padrões, ajustados pelo procedimento GLM. As médias dos efeitos controlados
118 foram comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro. Para análise dos
119 dados foi utilizado o programa estatístico SAS. v.8 (2000).

120

121 Resultados

122 Na Tab.1 é possível observar que os parâmetros cinéticos: motilidade total (MT), velocidade
123 curvilínea (VCL), velocidade linear (VSL) e velocidade média do percurso (VAP) sofreram
124 influência do diluente utilizado. Na motilidade total e na velocidade curvilínea foi observado
125 que os diluentes adicionados de 15% de gema de ovo (T1 e T2) foram significativamente
126 superiores ($p < 0,05$) ao diluente ACP-102[®] sem adição de gema de ovo (T3). O diluente a base
127 ACP-102[®] adicionado de 15% de gema de ovo foi significativamente superior ($p < 0,05$) aos
128 demais tratamentos nos parâmetros cinéticos de velocidade linear e velocidade média do
129 percurso.

130

131

132

133 **Tabela 01.** Médias e erros-padrão ajustados das variáveis motilidade total (MT), velocidade
 134 curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade média do percurso
 135 (VAP, $\mu\text{m/s}$) em função dos diluentes utilizados (T1: TRIS + 15% de gema de ovo; T2: ACP-
 136 102[®] + 15% de gema de ovo e T3: ACP-102[®]) no sêmen ovino.

137

TRAT	MT	VCL	VSL	VAP
T1	93,93 \pm 1,79 a	150,96 \pm 5,49 a	64,11 \pm 4,37 b	87,95 \pm 4,33 b
T2	96,63 \pm 1,80 a	157,29 \pm 4,50 a	91,69 \pm 4,37 a	107,87 \pm 4,33 a
T3	87,30 \pm 1,85 b	130,06 \pm 6,51 b	74,99 \pm 5,68 b	88,91 \pm 4,47 b

138 *Letras diferentes na coluna diferem entre si para $p < 0,05$.*

139

140 Na interação entre diluente e tempo de conservação (Tab.2) foram observadas diferenças
 141 significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN),
 142 retilinearidade (SRT), deslocamento lateral da cabeça (ALH) e batimento cruzado de cauda
 143 (BCF). A MP no tempo de conservação de 24 horas foi significativamente inferior no diluente
 144 Tris adicionado de 15% de gema de ovo ($16,15 \pm 5,71$) quando comparado ao diluente ACP-
 145 102[®] adicionado ou não de gema de ovo ($54,07 \pm 5,71$ e $47,52 \pm 5,71$ respectivamente).
 146 O tempo de armazenamento do sêmen refrigerado a 5 °C e o diluente utilizado também
 147 afetaram a viabilidade espermática (Tab.3) Em todos os tempos de avaliação (0h, 6h e 24h)
 148 não foram observadas diferenças significativas entre os diluentes T1 e T2, entretanto, ambos
 149 foram significativamente superiores ($p < 0,05$) ao diluente T3. Os três diluentes se
 150 comportaram de maneira semelhante, com o decorrer do tempo de armazenamento a 5 °C, a
 151 viabilidade espermática diminuiu significativamente em relação ao sêmen fresco diluído.

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161 **Tabela 02.** Médias e erros-padrão ajustados das variáveis motilidade progressiva (MP, %),
 162 linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), amplitude lateral da cabeça do
 163 espermatozoide (ALH, $\mu\text{m/s}$) e frequência de batimento cruzado (BCF, Hz) em
 164 função da interação diluente (T1: Tris + 15% de gema de ovo; T2: ACP-102[®] +
 165 15% de gema de ovo e T3: ACP-102[®]) e do tempo de conservação (0, 6 e 24 horas)
 166 a 5 °C do sêmen ovino.

TRAT	TEMPO	MP	LIN	STR	ALH	BCF
T1	0h	62,33 \pm 5,71a	57,90 \pm 2,87b	84,35 \pm 2,39a	2,43 \pm 0,16b	25,40 \pm 1,22ab
	06h	51,78 \pm 5,71a	45,10 \pm 2,87bc	76,75 \pm 2,39b	3,35 \pm 0,16a	24,33 \pm 1,22b
	24h	16,15 \pm 5,71b	28,18 \pm 2,87d	55,75 \pm 2,39c	3,48 \pm 0,16a	19,62 \pm 1,22c
T2	0h	62,92 \pm 5,71a	60,63 \pm 2,87a	85,20 \pm 2,39a	2,70 \pm 0,16b	27,02 \pm 1,22ab
	06h	60,00 \pm 5,71a	62,93 \pm 2,87 a	86,28 \pm 2,39a	2,68 \pm 0,16b	26,38 \pm 1,22 ab
	24h	54,07 \pm 5,71a	50,55 \pm 2,87b	81,73 \pm 2,39a	3,23 \pm 0,16a	28,15 \pm 1,22a
T3	0h	54,72 \pm 6,26a	54,62 \pm 3,14a	80,00 \pm 2,62ab	2,52 \pm 0,18b	25,30 \pm 1,34ab
	06h	50,50 \pm 5,71a	59,92 \pm 2,87a	86,02 \pm 2,39a	2,50 \pm 0,16b	27,70 \pm 1,22ab
	24h	47,52 \pm 5,71a	56,62 \pm 2,87ab	85,52 \pm 2,39b	2,73 \pm 0,16b	28,03 \pm 1,22a

167 *Letras diferentes na coluna diferem entre si para $p < 0,05$.*

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182 **Tabela - 3.** Média, erros-padrão e percentuais de viabilidade espermática, comparados em
 183 função do tratamento (T1: Tris + 15% de gema de ovo; T2: ACP-102 + 15% de
 184 gema de ovo, e T3: ACP-102 sem gema de ovo) e do tempo de conservação (0, 6
 185 e 24 h) a 5 °C do sêmen ovino

TRATAMENTO	TEMPO	Viabilidade espermática (%)
T1	0h	146,16 ± 2,64 Aa (73%)
	06h	133,16 ± 3,02 Aab (67%)
	24h	126,16 ± 6,46 Ab (63%)
T2	0h	140,66 ± 5,19 Aa (70%)
	06h	137,83 ± 4,84 Aab (69%)
	24h	132,00 ± 7,00 Ab (66%)
T3	0h	125,50 ± 3,84 Ba (63%)
	06h	110,66 ± 6,86 Bab (55%)
	24h	116,66 ± 9,86 Bb (58%)

186 *Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem significativamente (p<0,05) por tratamento;*
 187 *Letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente (p<0,05) por tempo de*
 188 *conservação;*

189

190 **Discussão**

191 A padronização da água de coco *in natura* em água de coco em pó (ACP) permitiu a
 192 conservação de suas características benéficas que a classifica como um bom diluente seminal
 193 (Blume e Marques Jr., 1994; Salgueiro *et al.*, 2002) e a partir de então, diversos trabalhos já
 194 foram publicados relatando a eficiência da utilização do ACP como diluente seminal.

195 Entretanto, poucos relatos existem sobre a qualidade do sêmen ovino refrigerado a 5 °C e
196 conservado por até 24 horas.

197 Figuerêdo (2006) utilizando uma metodologia diferente da utilizada nesse estudo, obteve
198 também resultados satisfatórios de motilidade e viabilidade espermática do sêmen ovino
199 refrigerado a 4 °C , e diluído em meios de conservação a base de água de coco adicionado ou
200 não de gema de ovo. Também observou a tendência de que quanto maior for o tempo de
201 conservação do sêmen refrigerado, menor será a qualidade seminal e maior será sua
202 necessidade de adição de gema de ovo.

203 Neste estudo foi observado que o diluente a base de água de coco em pó adicionado de gema
204 de ovo (ACP-102[®] + 15% de gema de ovo) resultou em uma maior proteção da motilidade do
205 sêmen ovino refrigerado a 5 °C e armazenado por até 24 horas quando comparado ao demais
206 diluentes testados. Ressaltando que os valores de motilidade total e progressiva têm sido
207 apontados como indicadores da qualidade seminal (Verstegen *et al.*, 2002).

208 A hiperativação é um processo que o espermatozoide apresenta durante o seu progresso no
209 oviduto da fêmea, sendo descrito como um movimento vigoroso, não progressivo, não linear e
210 está relacionado com o processo de capacitação e fertilização (Verstegens *et al.*, 2002). O
211 espermatozoide ovino pode ser considerado hipertivado quando $VCL > 250.0 \mu\text{ms}^{-1}$, $VSL <$
212 $100.0 \mu\text{ms}^{-1}$, $LIN < 30\%$, e $ALH_{\text{max}} \geq 9.0 \mu\text{m}$ (Mortimer; Maxwell, 1999). Apesar de não ter
213 alcançado todas as médias nesses dados, o sêmen diluído em Tris adicionado de gema de ovo,
214 parece induzir alterações na motilidade espermática do sêmen ovino refrigerado a 5 °C no
215 tempo de conservação de 24 horas. O mesmo foi observado por Yániz *et al.*, (2011), quando
216 refrigerou o sêmen ovino a 15 °C durante 48 horas também diluído em TRIS.

217 Os valores de motilidade total e progressiva do diluente ACP-102 adicionado ou não de gema
218 de ovo estão de acordo com aqueles obtidos por diversos autores, que conservaram o sêmen
219 ovino refrigerado a 5 °C ou a 15 °C (Bucak e Tekin, 2007; Yániz *et al.*, 2010; Castro, 2011).

220 A gema de ovo teve papel fundamental na crioproteção espermática durante a refrigeração e
221 conservação a 5 °C. O diluente ACP-102[®] sem adição de gema de ovo obteve resultados
222 inferiores na maioria dos parâmetros cinéticos estudados. Entretanto, este diluente conseguiu
223 manter a qualidade satisfatória do sêmen ovino, além de ter sido superior ao diluente TRIS
224 adicionado de gema de ovo, nos parâmetros de motilidade progressiva e linearidade no tempo
225 de conservação de 24 horas. E isto constitui uma grande vantagem deste diluente, por ser um
226 produto de origem vegetal e livre de substâncias de origem animal, que implicam em risco
227 biológico e sanitário (Gil *et al.* 2003).

228 Os dados obtidos nesse estudos indicam que o diluente ACP-102[®] adicionado ou não de gema
229 de ovo deve ser considerado como uma alternativa de baixo custo, de origem vegetal e de
230 melhor manutenção da qualidade seminal quando comparada ao diluente comercial TRIS.

231 Estudos futuros *in vivo* são necessários para comprovação dos resultados obtidos neste estudo
232 *in vitro*.

233

234 Conclusão

235 O diluente ACP-102[®] adicionado ou não de gema de ovo é capaz de manter a qualidade do
236 semen ovino refrigerado a 5° C e armazenado por até 24 horas. Sendo desta forma indicada
237 sua utilização em processos de biotecnologia da reprodução ovina.

238 Referências bibliográficas

239 BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y. *et al.*, *Manuel de formation pour l'insémination*
240 *artificielle chez les ovins et les caprins*, 1993, p.121-170.

241 BLUME, H.; MARQUES JR., A. P. V. Avaliação da água de coco no cultivo e
242 criopreservação de embriões murídeos. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v.18, p.97-104, 1994.

243 BUCAK, M.N.; TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the
244 liquid storage of ram semen. *Small Rum. Res.*, v.73, p.103–108, 2007.

245 CASTRO, E.V. *Adição de antioxidante ao sêmen ovino diluído em água de coco em pó ACP-*
246 *102[®] e resfriado a 5 °C por 48 horas*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias -
247 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará.

248 FIGUEIRÊDO, E.L. *Avaliação in vitro e in vivo do sêmen ovino resfriado em diluidores à*
249 *base de água de coco no estado do Ceará*. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências
250 Veterinárias - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual
251 do Ceará.

252 GIL J.L., NIELS S.L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature,
253 and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, v.59,
254 p. 1241-1255, 2003.

255 GUNDOGAN, M.; YENI, D.; AVDATEK, F.; FIDAN, A.F. Influence of sperm
256 concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with
257 oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.*, v.122,
258 p.200–207, 2010.

259 MACHADO, V.P.; NUNES, J.F.; ARAÚJO, A.A. *et al.*, Fertilidade após a inseminação
260 artificial intra- cervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base
261 de água de coco. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 43, p.43-49, 2006.

262 MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen — a review. *Reprod.*
263 *Fert. Dev.*, v.5, p. 613–638, 1993.

264 MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M. Kinematic definition of ram sperm Hyperactivation.
265 *Reprod. Fert. Dev.*, v.11, p.25–30, 1999.

266 OLIVEIRA, R.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. *et al.*, Avaliação morfológica de
267 espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (acp-
268 101) ou tris, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. *Ciên. Anim. Bras.*, v. 10, n. 3,
269 p. 862-869, 2009.

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

272 SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L. *et al.*, Utilização de diluentes a
273 base de água de coco “*in natura*” e em pó na inseminação artificial programada de cabras.
274 *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Supl., n. 5, p. 96-98, 2002.

275 TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G.H.; FRANCESCHINI, P.H.; MORATO, F.M.A.C.. Uso do
276 diluente água de coco em pó (ACP-103®) na conservação prolongada do sêmen do varrão:
277 avaliação in vitro e in vivo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.62, n.5, p.1072-1079, 2010.

278 UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; CARDOSO, J.F.S. *et al.*, Inseminação artificial com sêmen
279 refrigerado diluído em água de coco em pó (ACP®-106c) favorece o nascimento de fêmeas na
280 raça Buldogue Francês. *Acta Sci. Vet.*, v. 38, supl. 2, p. 692, 2010.

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

283 YÁNIZ, J.L.; MATEOS, J.A.; SANTOLARIA, P. Zwitterionic buffers preserve ram semen
284 quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. *Small Rum. Res.*, v.95, p.54–60,
285 2010.

8. CONCLUSÃO

De acordo com os parâmetros seminais pós descongelamento obtidos, conclui-se que o meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de 4% de óleo de coco extravirgem, pode ser utilizado como meio de criopreservação seminal para espermatozoides de caprinos, sendo uma alternativa aos diluentes existentes no mercado que possuem em sua composição produtos de origem animal, atribuindo desta forma uma maior biossegurança aos processos de conservação de material genético masculino.

O diluente ACP-102[®] adicionado ou não de gema de ovo é capaz de manter a qualidade do semen ovino refrigerado a 5° C e armazenado por até 24 horas. Sendo desta forma indicada sua utilização para processos de biotecnologia da reprodução ovina.

9. PERSPECTIVAS

Estudos futuros são necessários para aprimorar a utilização do meio de conservação a base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de óleo de coco extravirgem como diluente de sêmen de mamíferos. Assim como realizar testes *in vivo* para ter a confirmação de sua qualidade.

Novas pesquisas envolvendo a utilização do ACP-102[®] são necessárias para consolidar seu uso na conservação do sêmen ovino, principalmente em relação a estudos *in vivo* e aplicação comercial deste produto.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOAGLA, E.M.E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1160 – 1172, 2004.

AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v.60, p. 269-279, 2003.

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

AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COURTENS, L.J.; ANTON, M. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004.

AMIRAT-BRIAND, L.; BENCHARIF, D.; VERA-MUNOZ, O.; BEL HADJ ALI, H.; DESTRUMELLE, S.; DESHERCES, S.; SCHMIDT, E.; ANTON, M.; TAINURIER, D. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: preliminary results. **Theriogenology**, v.71, p.1209–1214, 2009.

ANDREEVA, A.A., SADIKOVA, D.G., LABBE, C., ANAN'EV, V.I., KURCHIKOV, A.L. Influence of lipids on ice formation during the freezing of cryoprotective medium. **Biofizika**, v.53, p.598–601, 2008.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins, 1993, p.121-170.

BARROS, T.B. **Qualidade espermática do sêmen suíno conservado a baixas temperaturas em diluentes alternativos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará.

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

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

BEZERRA, F.S.B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. **Acta Veterinária Brasileira**, v.4, p.20-25, 2010.

BISPO, C.A.S.; PUGLIESI, G.; GALVÃO, P.; RODRIGUES, M.T.; KER, P.G.; FILGUEIRAS, B.; CARVALHO, G.R. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. **Small Ruminant Research**, vol.100, p. 54-58, 2011.

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

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.

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

BUCAK, M.N.; TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. **Small Ruminant Research**, v.73, p.103–108, 2007.

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.

CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinária Brasileira**, v.2, p.67-75, 2008.

CASTRO, E.V. **Adição de antioxidante ao sêmen ovino diluído em água de coco em pó ACP-102[®] e resfriado a 5 °C por 48 horas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará.

CAVALCANTE, J.M.M. **Avaliação do sêmen ovino diluído e congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-102c) ou TRIS**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará.

CHAUHAN, M. S.; ANAND, S. R. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. **Theriogenology**, v.34, p.1003-1013, 1990.

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, 1991, 223p.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 2ª Ed., Belo Horizonte, 1998.

CORTEEL, J. M. **Colletion, processing and artificial insemination of goat semen**. Nouzilly – Fance: INRA, 1981, 28p.

CORTEEL, J. M. Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 5., **Proceedings...** New Delhi, India, 1992, v.2, p.290-297.

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.

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

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

DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v.68, p.168 –77, 2007.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Acribia, 1990, 192p.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats.** Butterworth, London, 1987, 194p.

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

FIGUEIRÊDO, E.L. **Avaliação in vitro e in vivo do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco no estado do Ceará.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará.

FIGUEIRÊDO, E.L.; NUNES, J.F.; CORDEIRO, M.A.; SOUZA, P.T.; DIÓGENES FILHO, R.N.; VIEIRA, V.E.; SILVA FILHO, A.H.S.; MESQUITA, F.L.T.; SALGUEIRO, C.C.M.; FEITOSA, J.V. Inseminação artificial de ovelhas da raça Santa Inês com sêmen diluído em água de coco in natura e em pó. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 14, n. 2, p. 95-97, 2007.

FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 1991.

FONTBONNE, A. L'insemination artificielle dans l'espece canine. In: REPRODUCTION CANINE, 1993, Paris. **Anais...** Paris: Association pour l'Étude de la Reproduction Animale, p.6, 1993.

FREITAS, V.J.F. **Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina coriônica (eCG) inseminadas artificialmente.** 1988. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1988.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender (AndromedR) in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, P.286-289, 2008.

GIL J.L., NIELS S.L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, p. 1241-1255, 2003.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** v.12, p.131-147, 1995.

GUNDOGAN, M.; YENI, D.; AVDATEK, F.; FIDAN, A.F. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.200–207, 2010.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6 ed., Barueri-SP: Manole, p.582, 1995.

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

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 3-22, 2000.

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

HU, J.H.; LI, Q.W.; LI, G.; CHEN, X.Y.; YANG, H.; ZHANG, S.S.; WANG, L.Q. The cryoprotective effect on frozen–thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. **Journal of Animal Science**, v.19, p.486–494, 2006.

HU, J.H.; LI, Q.W.; JIANG, Z.L.; LI, W.Y. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. **Cryobiology**, v.57, p. 257–262, 2008.

HU, J.H.; LI, Q.W.; JIANG, Z.L.; ZAN, L.S. ; AN, J.H.; WANG, L.Q. ; JIA, Y.H. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. **Animal Reproduction Science**, v.117, p.11–17, 2010.

HU, J.H.; JIANG, Z.L.; LV, R.K. ; LI, Q.W.; ZHANG, S.S.; ZAN, L.S. ; LI, X. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. **Cryobiology**, v.62, p.83-87, 2011.

IBGE/IPECE, Perfil básico municipal, 2009. Governo do Estado do Ceará. Disponível em <<http://www.ipece.ce.gov.br/>>, Data de acesso: Maio de 2013

IRITANI, A.; NISHIKAWA. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen; IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v.10, p.44-51, 1961.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine sêmen. **Ars Veterinaria**, v. 10, p.156-165, 1994.

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.

JIANG, Z.L.; LI, Q.W.; LI, W.Y; HU, J.H.; ZHAO, H.W.; ZHANG, S.S. Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing–thawing boar sperm by neutral comet assay. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.401–407, 2007.

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

LLEÓ, C.A. **Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del “Sperm Class Analyzer”**. Valencia, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade de Valencia, Espanha, 2003.

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

MACHADO, R.; SIMPLICIO, A. A. Efeito do tipo racial e da época do ano sobre o ejaculado de caprinos criados em região semi-árida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.433, 1991.

MARINA, A.M.; CHEMAN, Y.B.; AMIN, I. Virgin coconut oil: emergin functional food oil. **Trends Food Scitechnol**, v.20, p.481-487, 2009.

MARQUES, A.L.V. Água de coco. **Informativo Socego**, v.2, p.92, 1982.

MARTIN, C.E.G. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos criopreservados**. 2005. 26f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

MATSUOKA, T.; IMAI, H.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 5, 2006.

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Ed. Acribia, S.A., Madrid, 1990.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MELO, C.C.S. **Conservação de sêmen caprino a 4 °C utilizando ACP-101 com duas concentrações de *Aloe vera* ou gema de ovo**. Fortaleza, 2010. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 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.

MORTIMER, S. T. **CASA – Practical Aspects**. p.515-524, 2000.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M. Kinematic definition of ram sperm Hyperactivation. **Reproduction Fertility and Development**, v.11, p.25–30, 1999.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by na easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.

NEVIN, K.G. ; RAJAMOHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. **Clinical Biochemistry**, v.37, p.830-835, 2004.

NORDSTOGA, A.B.; SÖDERQUIST, L.; ADNØY, T.; PAULENZ, H. Fertility results after vaginal deposition of frozen-thawed buck semen diluted with two different extenders using one- or two-step procedures. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p. 82-86, 2011.

NUNES, J. F. **Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des espermatozöides de bouc**. 1982. Thèse (Doctorat) - 3e cycle, Paris VI, Paris, França, 1982.

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

NUNES, J. F. Artificial insemination in goats. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE CAPRINOS, 4., 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.; PRYSCILA, L. Utilisatio d'une substance active "JYP" present dans l'eau de coco pour la conservation *in vitro* et la fertilité des spermatozoides des mammifères. S.I.: Sn. 1994.

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, 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.

NUNES J. F. **Inseminação artificial em caprinos**. In: Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Varela, cap.5, p.83-104, 2002.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C.M. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. **Small Ruminant Research**, v.98, p. 176-184, 2011.

OLIVEIRA, R.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; CAVALCANTE, J.M.M.; MOURA, A.A.A.; ARAÚJO. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (acp-101) ou tris, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 862-869, 2009.

PRADO, R.B.; KOIVISTO, M.B.; CARREIRA, J.T.; PERRI, S.H.V.; RODRIGUES, L.H.; ATIQUÉ NETTO, H.; TORREGROSSA, T.L.G.; VICENTE, W.R.R.; FELICIANO, M.A.R. Efeito da utilização de diferentes diluidores para a produção *in vitro* de embriões bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1118–1126, 2012.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 6, p. 215-225, 2006.

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

RITAR, A.J.; BALL, P.D.; O'MAY, P.J. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v.2, p.27-34, 1990.
ROCA, J.; CARRIZOSA, J. A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VASQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5 °C. **Small Ruminant Research**, v.25, p.147-153, 1997.

ROCA, J.; MARTÍNEZ, S.; VASQUEZ, J. M.; LUCAS, X.; PARRILA, I.; MARTINEZ, E. A. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 °C. **Animal Reproduction Science**, v.64, p.103-112, 2000.

ROOF, D.J.; BOWLEY, S.; PRICE, L.L.; MATSAS, D.J. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. **Theriogenology**, v.77, p.412-120, 2012.

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

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

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.E.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes a base de água de coco "*in natura*" e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl., n. 5, p. 96-98, 2002.

SALLES, M.G.F. **Água de coco (Cocos nucifera L.) "in natura" e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor de sêmen caprino**. 1989. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 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. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.1934-1942, 2006.

SARIOZKAN, S.; BUCAK, M.N.; CANTURK, F.; OZDAMAR, S.; YAY, A.; TUNCER, P.B.; OZCAN, S.; SORGUCU, N.; CANER, Y. The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4 °C. **Cryobiology**, v.65, p. 93-97, 2012.

SCHINDLER, H.; AMIR, D. Longevity of ram sperm in various diluent and at different dilution rates. **Journal Agricultural Science**, v.56, p.183-189, 1961.

SILVA, T.F.P. **Avaliação andrológica, métodos de coleta e tecnologia do sêmen de gatos domésticos utilizando água de coco em pó (ACP-117[®])** 2008. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará.

SIQUEIRA, A.P. **Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado**. 2006. Dissertação (Universidade Federal de Minas Gerais- Escola de Veterinária), Belo Horizonte, 106 p., 2006.

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.; TONIOLLO, G.H.; FRANCESCHINI, P.H.; MORATO, F.M.A.C.. Uso do diluente água de coco em pó (ACP-103[®]) na conservação prolongada do sêmen do varrão: avaliação in vitro e in vivo. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1072-1079, 2010

TRALDI, A.S. Biotécnicas Aplicadas em Reprodução de Pequenos Ruminantes. In: FEINCO 3, 2006.

TULI, R.K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.42, p.547-555, 1994.

UCHOA, D.C. **Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluidores à base de água de coco**. 2004. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; CARDOSO, J.F.S.; MOTA FILHO, A.C.; JUCA, R.P.; SILVA, A.R., SILVA, L.D.M. Inseminação artificial com sêmen refrigerado diluído em água de coco em pó (ACP[®]-106c) favorece o nascimento de fêmeas na raça Buldogue Francês. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, supl. 2, p. 692, 2010.

VARELA JUNIOR, A.S. ; CORCINI, C.D. ; ULGUIM, R.R. ; ALVARENGA, M.V.F. ; BIANCHI, I. ; CORREA, M.N. ; LUCIA JR., T. ; DESCHAMPS, J.C. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.323- 327, 2009.

VÁZQUEZ, I.; CALDERÓN, F.; CASTILLO, M., et al. Influencia de la presión osmótica de los diluyentes en la conservación del esperma refrigerado de mmoruecos. In: JORNADAS INTERNACIONALES DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 4., **Anales...** 1989. León, Espanha.

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

VISIOLI, F.; BELLOMO, G.; MONTEODORO, G.; GALLI, C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. **Atherosclerosis**, v.117, p.25-32, 1995.

YÁNIZ, J.L.; MATEOS, J.A.; SANTOLARIA, P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. **Small Ruminant Research**, v.95, p.54-60, 2011.

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