

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

EMMANUELLE LIMA DE FIGUEIRÊDO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO SÊMEN OVINO RESFRIADO EM
DILUIDORES À BASE DE ÁGUA DE COCO NO ESTADO DO CEARÁ**

**FORTALEZA
2006**

EMMANUELLE LIMA DE FIGUEIRÊDO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO SÊMEN OVINO RESFRIADO EM
DILUIDORES À BASE DE ÁGUA DE COCO NO ESTADO DO CEARÁ**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes

**FORTALEZA
2006**

F475a Figueirêdo, Emmanuelle Lima de.

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco no Estado do Ceará / Emmanuelle Lima de Figueirêdo. – 2006.

61p.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes
Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Reprodução Animal. 2. Ovino I.
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD 636.0826

EMMANUELLE LIMA DE FIGUEIRÊDO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO SÊMEN OVINO RESFRIADO EM
DILUIDORES À BASE DE ÁGUA DE COCO NO ESTADO DO CEARÁ**

Tese submetida à Coordenação do Curso de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da
Universidade Estadual do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Reprodução e
Sanidade Animal

APROVADA EM 06/10/2006

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Rômulo José Vieira
Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra
Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Aos meus pais, Jackson e Neli;
Aos meus irmãos, Jane, Jackson Filho e Eduarda;
Ao meu noivo Marcius;
Aos meus cunhados, André, Flávia e Márcio e
A minha sobrinha Ana Júlia,
por existirem.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela bolsa de estudos que me foi concedida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo;

À Universidade Estadual do Ceará por minha formação profissional;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, por ter me possibilitado a realização de mais uma conquista;

Ao Dr. José Ferreira Nunes, pela confiança, respeito que sempre depositou em mim e pelos ensinamentos que levarei comigo por toda a minha trajetória de vida;

À Ana Cláudia Nascimento Campos, Regiane Rodrigues dos Santos e Sâmia Brilhante pela amizade, paciência, consideração e força nos momentos mais difíceis;

Ao Dr. Airton Alencar de Araújo, pelos ensinamentos;

À Cristiane Clemente de Mello Salgueiro e ao Dr. João Monteiro Gondim (*in memoriam*) pela elaboração da água de coco em pó utilizada neste trabalho;

Aos companheiros de laboratório, Maria Audália Marques de Carvalho, Joaquim Hélder Teixeira Pinheiro, Artur Henrique Soares da Silva Filho, Virgílio Emanuel Vieira, Marina Albuquerque Cordeiro, Priscila Teixeira de Souza e Renato Nogueira Diógenes Filho, por serem sempre tão prestativos e amigos;

Ao Dr. José Valmir Feitosa, pela disposição com que me auxiliou na análise estatística deste trabalho;

Ao Sr. José Vieira Filho (seu Mazim), por ter possibilitado a execução de parte deste trabalho em sua propriedade, a fazenda Jantar;

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelo respeito com que sempre me trataram;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram comigo para a concretização de mais um sonho.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in vivo* o sêmen ovino em diluidores à base de água de coco após resfriamento, nos períodos chuvoso (fevereiro a abril) e seco (outubro a dezembro), no estado do Ceará. Foram utilizados quatro diluidores: água de coco *in natura* com e sem gema (ACING e ACIN) e ACP-102 com e sem gema (ACPG e ACP). O sêmen de quatro carneiros foi coletado, diluído e acondicionado em geladeira onde atingiu a temperatura de 4°C, momento em que foi realizado o teste de termorresistência (TTR) a 37°C por até 120 minutos, para avaliação do vigor (VIG) e motilidade (MOT), após 2, 24 e 48h de resfriamento. Ao final de cada TTR e tempo de resfriamento foi calculada a taxa de degradação da motilidade (TDM). Esfregaços de sêmen foram realizados para observação da morfologia espermática (ME). A fertilidade foi avaliada através da inseminação de 120 ovelhas no período seco e 94 no período chuvoso, distribuídas de acordo com o diluidor utilizado (ACN ou ACP) a 4°C por 24h. Todos os resultados foram expressos em média e desvio padrão e os parâmetros VIG, MOT, TDM e ME, foram submetidos ao Teste Tukey ($P < 0,05$). A taxa de fertilidade foi comparada entre os dois diluidores e os dois períodos e analisada através do teste do Qui-quadrado ($P < 0,05$). Com relação à adição da gema de ovo, foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) nos valores de MOT entre os diluidores testados durante todo o tempo de resfriamento, tanto na época chuvosa quanto na seca, com valores superiores obtidos nos diluidores adicionados de gema. Nenhum dos dois diluidores (ACN e ACP) apresentou efeito significativo sobre os resultados da taxa de prenhez. Foi observada diferença significativa somente entre as épocas chuvosa e seca ($p = 0,003$). Conclui-se que a adição de gema de ovo aos diluidores água de coco em pó e *in natura*, torna-se necessária para a manutenção da integridade e da qualidade do sêmen ovino resfriado a 4°C, por um período de até dois dias. Ambos diluidores à base de água de coco apresentam boa capacidade conservadora, pois mantêm o sêmen ovino viável e com níveis satisfatórios de fertilidade, mesmo após 24 horas de resfriamento a 4°C.

Palavras-chave: sêmen, ovino, fertilidade, diluidor, época do ano.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the ram semen in extenders based on coconut water after cooling, in the rainy (February to April) and dry (October to December) periods in the Ceará state. Four extenders were used: coconut water *in natura* with and without egg yolk (CWINY and CWIN) and CWP-102 with and without egg yolk (CWPY and CWP). The semen of four rams was collected, diluted and stored in a fridge where reached the temperature of 4°C, moment that was achieved the thermoresistance test (TT) at 37°C for up to 120 minutes to evaluation of vigor (VIG) and motility (MOT), after 2, 24 and 48 hours of cooling. Motility degradation rate (MDR) was calculated at the end of each TT and cooling period. Semen staining was achieved to observation of the spermatic morphology (SM). The fertility was evaluated by insemination of 120 ewes in the dry period and 94 in the rainy period, distributed according to the extender used (CWIN or CWP) at 4°C for 24h. All results were expressed in media and standard deviation and the VIG, MOT, MDR and SM parameters were submitted to Tukey test ($P < 0.05$). The fertility rate was compared between two extenders and two periods and analysed by Chi-square test ($P < 0.05$). Regarding addition of egg yolk, was observed significant difference ($P < 0.05$), in the values of MOT between extenders tested during all cooling time in both periods, with values superior obtained in the extenders added of egg yolk. No extenders (CWIN and CWP) presented significant result on the pregnancy rate. Significant difference was observed only between rainy and dry period ($p = 0.003$). In conclusion, the add of egg yolk at extenders coconut water in powder and *in natura* becomes necessary to the maintenance of integrity and quality of ram semen cooled at 4°C, for up to two days period. Both extenders based in coconut water shows good conservation capacity, because it maintains the ram semen viable and with satisfactory level of fertility, even after 24 hours of cooling at 4°C.

Keywords: semen, ram, fertility, extender, year season.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	01
1 INTRODUÇÃO.....	02
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 O sêmen e suas características.....	03
2.1.1 Espermatozóides.....	03
2.1.2 Plasma seminal.....	04
2.1.3 Fatores que influenciam as características do sêmen.....	05
2.2 Tecnologia do sêmen.....	07
2.2.1 Colheita do sêmen.....	07
2.2.2 Avaliação do sêmen.....	08
2.2.3 Teste de termorresistência (TTR).....	10
2.2.4 Morfologia espermática.....	11
2.2.5 Processamento do sêmen.....	12
2.2.6 Sêmen resfriado.....	13
2.3 Diluidores empregados na conservação do sêmen.....	14
2.4 Constituição dos diluidores.....	16
2.4.1 Gema de ovo.....	17
2.4.2 Glicerol.....	18
2.5 Água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos.....	19
2.6 Inseminação artificial.....	22
3 JUSTIFICATIVA.....	25
4 HIPÓTESES.....	26
5 OBJETIVOS.....	27
5.1 Objetivo geral.....	27
5.2 Objetivos específicos.....	27
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
6.1 Experimento <i>in vitro</i>.....	28
6.1.1 Local de execução.....	28
6.1.2 Diluidores.....	28
6.1.3 Água de coco em pó (ACP-102).....	28
6.1.4 Animais experimentais e colheita de sêmen.....	29

6.1.5 Resfriamento do sêmen.....	29
6.1.6 Teste de termorresistência.....	29
6.1.7 Avaliação da morfologia espermática.....	30
6.1.8 Análise estatística.....	30
6.2 Experimento <i>in vivo</i>	31
6.2.1 Local de execução.....	31
6.2.2 Animais experimentais e tratamento hormonal.....	31
6.2.3 Lotes experimentais.....	31
6.2.4 Colheita e diluição do sêmen.....	31
6.2.5 Inseminação artificial.....	32
6.2.6 Diagnóstico de gestação.....	32
6.2.7 Análise estatística.....	32
7 RESULTADOS	33
7.1 Experimento <i>in vitro</i>	33
7.2 Experimento <i>in vivo</i>	38
8 DISCUSSÃO	39
8.1 Experimento <i>in vitro</i>	39
8.2 Experimento <i>in vivo</i>	42
9 CONCLUSÕES	44
10 PERSPECTIVAS	45
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC	Anormalidade de cabeça
ACING	Água de coco <i>in natura</i> com gema
ACIN	Água de coco <i>in natura</i> sem gema
ACPG	Água de coco em pó (ACP-102) com gema
ACP	Água de coco em pó (ACP-102) sem gema
AF	Anormalidade de flagelo
°C	Graus Celsius
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
DPI	Defeito de peça intermediária
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
EDTA	Etileno-diamino-tetracético
GCD	Gota citoplasmática distal
GCP	Gota citoplasmática proximal
IA	Inseminação artificial
MAP	Acetato de Medroxiprogesterona
ME	Morfologia espermática
MIP	Motilidade individual progressiva
MOT	Motilidade progressiva
mOsm	Miliosmoles
P	Probabilidade
PEM	Porcentagem de espermatozóides móveis
pH	Potencial de hidrogênio
Sptz	Espermatozóides
SRD	Sem raça definida
TDM	Taxa de degradação da motilidade
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
TTR	Teste de termorresistência
UI	Unidades internacionais
VIG	Vigor espermático

1 INTRODUÇÃO

A técnica de inseminação artificial, seja utilizando sêmen resfriado ou congelado, tem proporcionado em muitos países um incremento significativo no melhoramento genético de seus rebanhos (COLAS, 1984). Embora a inseminação artificial seja considerada uma das mais valiosas práticas de manejo reprodutivo disponível aos criadores (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1990), no Brasil, esta tecnologia aplicada à espécie ovina ainda é pouco difundida (DIAS, 1993).

Como agravante, a tecnologia do sêmen ovino tem apresentado limitações no que diz respeito à técnica de conservação dos espermatozóides, pois apesar de todas as razões não estarem devidamente esclarecidas, sabe-se que os gametas masculinos da espécie ovina são muito sensíveis à variação da temperatura (GUERIN, 1990). Além disso, na região semi-árida do Nordeste do Brasil, são determinadas duas épocas, seca e chuvosa, que interferem na disponibilidade de alimentos e na temperatura e influenciam conseqüentemente a atividade sexual do macho caprino e ovino (SILVA e NUNES, 1984).

No Brasil, a utilização de diluentes alternativos parece ser a solução para a adoção da inseminação artificial pelos pequenos produtores, já que a dose de sêmen, principalmente importada, custa caro. A coleta e diluição de sêmen em soluções à base de água de coco, além de ser econômica, é prática devido à disponibilidade de cocos no Nordeste (SALGUEIRO et al., 2002).

Desta forma, a avaliação do sêmen diluído em água de coco em pó, poderá ser uma alternativa para amenizar os problemas relacionados com a conservação *in vitro* e conseqüente manutenção da capacidade fecundante *in vivo* dos espermatozóides da espécie ovina, tanto na época chuvosa quanto na seca.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O sêmen e suas características

Produto da ejaculação de um reprodutor, o sêmen é composto por espermatozóides, células responsáveis pela fecundação dos óvulos das fêmeas e produzidas nos testículos e por uma fração líquida denominada plasma seminal, produzida pelas glândulas acessórias (CORTELL, 1981) e pelos epidídimos do sistema genital masculino. Sua composição varia segundo as espécies (EVANS e MAXWELL, 1990).

2.1.1 Espermatozóides

Os espermatozóides são formados a partir do desenvolvimento de células germinativas presentes no interior dos túbulos seminíferos (HAFEZ, 1995). A estrutura do espermatozóide é formada por cabeça, colo, peça intermediária e flagelo, sendo este último subdividido em peça principal e peça terminal (BARTH e OKO, 1989).

A cabeça do espermatozóide é formada principalmente pelo núcleo. Entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo existe o acrossoma, uma estrutura de dupla camada de membranas que contém enzimas (hialuronidase e acrosina) responsáveis pela destruição do *cumulus oophorus* e da zona pelúcida do oócito durante a fecundação (BEARDEN e FUQUAY, 1997).

O colo é a região que liga a cabeça à peça intermediária e onde pode se localizar a gota citoplasmática proximal. A peça intermediária e o flagelo têm em sua constituição, dois microtúbulos centrais circundados por nove microtúbulos duplos, que é a constituição específica dos flagelos. Circundando esta estrutura, existem outras nove formações: as fibrilas densas externas. Revestindo a peça intermediária, existe uma bainha mitocondrial e uma bainha fibrosa, enquanto que o flagelo é revestido apenas pela bainha fibrosa (MIES FILHO, 1987). A movimentação da cauda se dá pelo deslizamento entre os microtúbulos, cuja energia para tal é

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

2.1.2 Plasma seminal

O plasma seminal é a porção fluida do sêmen, incorporada durante a ejaculação e formada por uma mistura de líquidos secretados pelas glândulas sexuais acessórias (vesiculares, bulbouretrais e próstata), pelos epidídimos e pelos ductos deferentes (EVANS e MAXWELL, 1990).

O plasma seminal atua como veículo para os espermatozóides serem transportados do trato genital do macho, ativa a sua motilidade e proporciona um meio rico em nutrientes e tamponado, necessário para manter a sobrevivência dos espermatozóides após sua deposição no trato genital feminino (EVANS e MAXWELL, 1990). Normalmente, apresenta pressão osmótica semelhante ao sangue e possui pH neutro, sendo a faixa ótima de pH para a motilidade espermática no sêmen ovino de 7,1 a 7,2 (UPRETI et al., 1995).

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

Há muito tempo que o sêmen tem sido objeto de intensas investigações bioquímicas, mas apesar dos consideráveis avanços, os conhecimentos sobre a função do plasma seminal ainda são obscuros. As modificações que ocorrem após o tratamento *in vitro* ocasionam variações do metabolismo e/ou sobrevivência dos espermatozóides. Além disso, a inexistência de mecanismos de eliminação das células espermáticas mortas, submete os gametas vivos a uma convivência com os produtos de sua decomposição (CORTEEL, 1980). SKANDHAN (1981) reconheceu

que as alterações de muitos dos componentes do plasma seminal são responsáveis pela incapacidade de fecundação do gameta.

Relatos em várias espécies sugerem que o plasma seminal contenha fatores que influenciam a fertilidade do macho (AURICH et al., 1996). Estes estudos são geralmente baseados na comparação do plasma seminal entre machos com fertilidades diferentes (AURICH et al., 1996) ou sobre o isolamento de fatores do plasma seminal que facilitam ou inibem a capacitação espermática e a fertilização (OLLERO et al., 1997). AURICH et al. (1996) demonstraram que a adição de plasma seminal de diferentes garanhões afetou a resistência de espermatozóides em suportar a congelação e descongelação. HENALT et al. (1995) demonstraram que a adição do plasma seminal aos espermatozóides da cauda do epidídimo de touros aumentou a fertilidade, quando comparada à fertilidade dos espermatozóides epididimários sem a adição do plasma seminal.

2.1.3 Fatores que influenciam as características do sêmen

Vários fatores intrínsecos e/ou extrínsecos podem causar variações nas características do sêmen de ovinos e caprinos. Dentre os intrínsecos: raça, peso corporal e idade; e os extrínsecos: fotoperíodo, latitude, temperatura e alimentação (MIES FILHO, 1987). Os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos, em geral, variam pouco, dentro da faixa de latitude na qual o Brasil está inserido (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1995). Segundo CAMPOS (2003), no Nordeste do Brasil, o período do ano não interfere significativamente na conservação do sêmen caprino de animais da raça Saanen, quando estes são submetidos ao manejo intensivo de criação.

No Nordeste do Brasil, os fatores climáticos interferem diretamente na disponibilidade de alimentos (fartura na estação chuvosa, escassez na estação seca). Outros elementos climáticos como: temperatura elevada, umidade relativa, intensidade luminosa podem também interferir na atividade sexual do macho caprino e ovino deslanado (SILVA e NUNES, 1984). Sabe-se que as temperaturas elevadas exercem efeitos deletérios na qualidade do sêmen, podendo produzir alterações como: elevação do pH e da porcentagem de espermatozóides anormais, redução da

motilidade, de concentração espermática, de volume e de porcentagem de espermatozóides móveis (CORTEEL,1981).

Neste sentido, o sistema termorregulador na bolsa escrotal, formado pelo plexo pampiniforme e pelas glândulas sudoríparas, atua tentando manter a temperatura testicular inferior à corpórea, de modo que a espermatogênese ocorra com sucesso, mantendo assim a qualidade do sêmen produzido (KASTELIC et al.,1996).

A intensidade pluviométrica no Nordeste brasileiro está diretamente correlacionada com a qualidade e a disponibilidade de pastagens para os animais, assim as chuvas interferem sobre o comportamento reprodutivo destes animais (NUNES,1988b). O volume do ejaculado é uma consequência do aumento dos fluidos das glândulas anexas e epidídimos (CORTEEL,1981) e está sob influência da época do ano, aumentando na estação chuvosa (SILVA e NUNES,1984).

Alguns estudos demonstram haver diferenças na qualidade do ejaculado de pequenos ruminantes entre as estações do ano em clima temperado (COLAS, 1980; NUNES, 1982; ROCA et al., 1992; TULI e HOLTS, 1995), e muitos deles atribuíram tais diferenças ao fotoperíodo. Sabe-se que o tamanho testicular, bem como a eficiência da espermatogênese de carneiros depende de níveis hormonais elevados durante a estação sexual (reprodutiva) que diminuem durante a estação não sexual (COLAS,1980).

A amplitude destas variações estacionais varia substancialmente de acordo com o indivíduo e a raça (CORTEEL,1975). A avaliação desta variabilidade é requerida para uma boa utilização dos animais em programas de inseminação artificial (PÉREZ e MATEOS-REX,1996; MANDIKI et al.,1998). Em ovinos, a frequência de colheita pode influenciar a composição iônica e a atividade enzimática no plasma seminal, bem como, os parâmetros espermáticos e a produção diária de espermatozóides (KAYA et al., 2002).

Segundo MACHADO e SIMPLÍCIO (1995), as variações de temperatura, pluviosidade, umidade relativa do ar e insolação refletem-se não só diretamente nos

animais, mas alteram o ambiente, alterando o aporte nutritivo-alimentar dos caprinos, com conseqüente modificação dos fatores que regem a homeostasia e a espermatogênese. No Rio Grande do Sul foram realizados estudos sobre a influência da alimentação sobre a qualidade espermática e foi observado que a época do ano afeta a porcentagem de espermatozóides anormais e em menor grau o volume e a concentração espermática, quando os animais são mantidos em pastagem natural, indicando que esta deficiência deve-se ao manejo alimentar e não ao fotoperíodo (SELAIVE-VILLARROEL et al., 1985).

2.2 Tecnologia do sêmen

2.2.1 Colheita de sêmen

Existem dois métodos para a colheita do sêmen, denominados como o de vagina artificial e o da estimulação elétrica (eletroejaculador). Dentre os dois citados, prefere-se o primeiro devido a sua rapidez e limpeza, por não ser estressante para o reprodutor e proporcionar um sêmen coletado de melhor qualidade (EVANS e MAXWELL, 1990).

Na colheita do sêmen em carneiros e bodes, utiliza-se a vagina artificial, instrumento que simula as condições de pressão e temperatura da vagina da fêmea, sendo constituída por um tubo de PVC rígido, um tubo elástico de borracha e uma válvula, por onde deve passar a água a 40°C. Em uma das extremidades desta estrutura acopla-se um copo coletor graduado (NUNES et al., 1997). A colheita do sêmen, com o uso da vagina artificial, pode ser realizada com o auxílio de uma fêmea ou de um manequim. No primeiro caso, não estando o macho habituado ao processo, deve-se lançar mão de uma fêmea em estado de cio (MIES FILHO, 1987).

Os manequins mecânicos apresentam vantagens sobre os manequins vivos no sentido de proporcionarem estabilidade e quanto às fêmeas particularmente, por permitirem o controle de doenças. Os manequins vivos devem

ser contidos para diminuir movimentos laterais e para frente e ainda proporcionar fácil acesso para a colheita de sêmen (HAFEZ, 1995).

O método de colheita do sêmen é simples. A fêmea em estro natural ou induzido é segurada para ser apresentada ao macho. Quando este efetuar o salto, segura-se o prepúcio com a mão, desviando o pênis para a vagina artificial (GONSALVES et al., 2001).

A estimulação elétrica deve ser utilizada quando é necessária a colheita de sêmen de um macho impossibilitado de ser treinado à vagina artificial. O sêmen obtido por este método apresenta maior volume, porém menor concentração, quando comparado com a colheita por vagina artificial. No entanto, a eletroejaculação é útil para testar a fertilidade de um grande número de machos caprinos e ovinos (EVANS e MAXWELL, 1990).

Recomenda-se que os estímulos elétricos sejam aplicados a cada sete segundos com o aumento de 1 volt. A ejaculação ocorre com quatro a sete estímulos. O sêmen pode ser colhido com o animal de pé ou deitado de lado sobre uma mesa. A glândula do pênis deve ser levemente segurada com uma gaze estéril de modo que o apêndice filiforme e a uretra sejam dirigidos para dentro do tubo de colheita antes da ejaculação para diminuir a perda de sêmen (HAFEZ, 1995).

2.2.2 Avaliação do sêmen

O método ideal para avaliar a fertilidade do reprodutor, além de sua habilidade na cobertura de fêmeas, é o exame do sêmen (HAFEZ, 1995). A avaliação da qualidade espermática geralmente está ligada ao desejo de prever a fertilidade dos reprodutores para servirem nos rebanhos ou para serem utilizados em programas de reprodução programada (CBRA, 1998).

Uma avaliação de sêmen completa deve ser realizada para indicar animais sub-férteis, inférteis e estéreis. O sêmen deve ser colhido por meio de vagina artificial e avaliado em microscópio, quanto às suas características físicas e

morfológicas (MAIA, 2002). Segundo BARIL et al. (1993), o sêmen deve ser avaliado de acordo com as seguintes características:

- Volume: varia de 0,5 a 2,0 mL;
- Cor: deve ser amarelada nos caprinos e branca nos ovinos, desprezando-se o sêmen de coloração avermelhada ou com cor de chocolate, indicando presença de sangue ou pus, respectivamente;
- Aspecto: variando de leitoso a cremoso, desprezando-se o sêmen aquoso ou turvo, indicativo de pequeno número de espermatozóides;
- Concentração: determinada no espectrofotômetro ou no microscópio segundo a técnica empregada em hematimetria; significa a quantidade de espermatozóides em cada mililitro de sêmen. O valor normal está em torno de três bilhões / mL;
- Turbilhonamento (motilidade massal): movimento de massa de espermatozóides no plasma seminal. Assemelha-se às ondas do mar e pode receber notas de 0 (sem movimento) a 5 (movimentos muito fortes);
- Motilidade individual progressiva (MIP) ou vigor (VIG): movimento de flecha de cada espermatozóide (escala de 0 a 5). Para a inseminação artificial devem ser utilizados somente ejaculados que apresentarem valores para motilidade igual ou superior a três;
- Porcentagem de espermatozóides móveis (PEM) ou motilidade (MOT): porcentagem de espermatozóides observados ao microscópio, num mesmo campo, que apresentam a mesma motilidade. Assim como a MIP, a PEM só pode ser observada após diluição do sêmen;
- Morfologia espermática: porcentagem de espermatozóides patológicos (sem cauda, com cauda dupla, com dupla cabeça etc.) dentro da população espermática, não devendo ultrapassar 15% (caprinos) e 20% (ovinos).

Muitos testes de motilidade, morfologia e metabolismo espermático têm sido correlacionados com a fertilidade. A avaliação da motilidade espermática é a mais amplamente utilizada, já que pode ser executada mais rapidamente, e a porcentagem de espermatozóides móveis tem uma boa correlação com a fertilidade (FOOTE, 2003). A motilidade e a morfologia espermática são as características

seminais mais utilizadas para se avaliar o potencial reprodutivo do macho (CORREA et al., 1997).

A motilidade espermática é essencial para que o espermatozóide atravesse o sistema genital feminino até o oviduto, para fertilizar o ovócito (CAMERON, 1977). Este parâmetro é especialmente importante em ovinos, devido às particularidades anatômicas da cérvix (EVANS e MAXWELL, 1990).

2.2.3 Teste de Termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência tem sido empregado por vários autores para prever a fertilidade de machos em várias espécies e para discriminar diluidores de conservação do sêmen ovino (MAMPOUYA, 1973), observando-se também, uma correlação positiva entre os resultados do teste e a fertilidade de fêmeas inseminadas.

Os espermatozoides precisam de várias horas após a ejaculação ou inseminação artificial para atingir o local de fecundação nas fêmeas (HAFEZ, 1995). Seu poder fecundante está conseqüentemente, em parte ligado a sua sobrevivência no sistema genital da fêmea (MIES FILHO, 1987). Esta observação tem levado a utilização de testes de termorresistência à temperatura corpórea da fêmea, *in vitro*, para avaliar a sobrevivência espermática (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991).

As condições de incubação variam com a espécie e com o tipo de processamento de sêmen a testar (fresco, resfriado ou congelado), mas em caprinos e ovinos, o sêmen é geralmente diluído em concentrações compreendidas entre 80 e 300 x 10⁶ spz/mL, e colocado em banho-maria a 37 - 38°C (CBRA, 1998). A porcentagem de espermatozoides móveis e a motilidade individual progressiva podem ser calculadas ao início do teste e duas a três horas após a incubação (BARIL et al., 1993).

Segundo CORTEEL (1981), a porcentagem de espermatozoides móveis (PEM) e a motilidade individual progressiva (MIP) são os parâmetros mais

comumente utilizados para mensuração da qualidade do sêmen. A MIP refere-se ao vigor ou intensidade de movimentação linear dos espermatozóides, que é avaliada num escore de 0 – 5, onde zero corresponde à ausência de espermatozóides móveis e cinco à máxima movimentação progressiva (CORTEEL, 1974, 1981; NUNES, 1980).

À medida que a duração de incubação a 37°C prossegue, há o acúmulo de ácido láctico e o valor de pH tende a diminuir, acidificando o meio, o que leva a um declínio gradual na atividade metabólica. Estas mudanças no acúmulo de ácido láctico podem ser atribuídas à presença de flora microbiana no meio diluidor (SINGH et al., 1982).

2.2.4 Morfologia espermática

O sêmen da maioria dos machos apresenta alguns espermatozóides anormalmente formados (HAFEZ, 1995). Nesse aspecto, a morfologia espermática tem sido identificada como uma das características que podem ser usadas na predição da fertilidade espermática (BUENDIA et al., 2002). Assim, a avaliação da qualidade do sêmen tem que considerar que a competência funcional é determinada por vários fatores. A avaliação do estado morfológico e da motilidade do espermatozóide é indicação crucial de sua capacidade fertilizante (BLOTTNER et al., 2001).

Todo ejaculado de sêmen conterá alguns espermatozóides morfolologicamente anormais. Uma proporção de 8 a 10% não tem efeito adverso sobre a fertilidade, entretanto se esta porcentagem ultrapassar 25% do total, pode-se esperar uma fertilidade diminuída (BEARDEN e FUQUAY, 1997). Em ovinos, a porcentagem de anormalidade máxima permitida, ou seja, que não interfira na fertilidade dos espermatozóides é 20% (CBRA, 1998). A morfologia espermática, especialmente da cabeça, tem recebido considerável atenção em relação à habilidade do espermatozóide em promover uma fertilidade normal (AZIL et al., 1998).

As alterações morfológicas podem atingir as diversas partes constituintes dos espermatozóides, como por exemplo, acrossoma, núcleo, colo, peça intermediária, flagelo e, em alguns casos, tomar duas ou mais partes da célula simultaneamente (MIES FILHO, 1987). Estas alterações podem ser primárias, secundárias ou terciárias (HAFEZ, 1995). As anormalidades primárias são devido à falha na espermatogênese, enquanto que as secundárias ocorrem durante a passagem pelos epidídimos. Aquelas que ocorrem durante ou após a ejaculação e por manipulação inadequada da amostra são designadas anormalidades terciárias (HAFEZ, 1995).

Segundo COLAS (1980), as anormalidades são classificadas em: anormalidade de cabeça (microcefalia, cabeça piriforme, acrossoma danificado), cabeça sem flagelo, gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal e anormalidade de flagelo (flagelo curvo, quebrado, peça principal enrolada até antes da peça intermediária ou enrolada sobre a intermediária). E quando um mesmo espermatozóide apresenta duas anormalidades, somente a mais grave é reconhecida.

A morfologia espermática (BARTH e OKO, 1989), particularmente a integridade do acrossoma (YANAGIMACHI, 1994), é um importante indicador de fertilidade. Contudo, as correlações entre os tradicionais parâmetros *in vitro* e as taxas de parição são geralmente baixas na espécie ovina, e a morfologia espermática é, até o momento, o teste mais acurado para avaliar a qualidade inicial do ejaculado (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991).

2.2.5 Processamento do sêmen

O sêmen pode ser processado de diferentes maneiras, podendo ser utilizado:

- Fresco (puro ou diluído);
- Resfriado 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 resfriado, para utilização em um curto espaço de tempo ou congelado em nitrogênio líquido, o que favorece a sua conservação por um longo período de tempo, prolongando assim, o seu emprego (NUNES, 1988a).

O sêmen fresco ou resfriado apresenta fertilidade mais elevada; o congelado preserva-se por um período de tempo indefinido, se mantido em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C e é de maior aplicabilidade, quando comparado ao sêmen resfriado a temperatura de 4°C , cuja viabilidade máxima é de 48 horas para os caprinos utilizando o diluidor água de coco *in natura* (NUNES, 1988) e 24 horas em ovinos utilizando o leite (COLAS, 1980).

Independente do diluidor, da taxa de diluição, da temperatura ou das condições de armazenamento, os espermatozóides se deterioram à medida que a duração do armazenamento aumenta. As principais mudanças que ocorrem durante a estocagem incluem redução na motilidade, na integridade morfológica e na fertilidade do espermatozóide. Estas mudanças são acompanhadas de declínio na sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo feminino e aumento de perda embrionária (MAXWELL e SALAMON, 1993; SALAMON e MAXWELL, 2000).

2.2.6 Sêmen resfriado

O emprego de sêmen resfriado vem se tornando cada vez mais popular, aumentando significativamente seu uso durante a última década, em decorrência da praticidade e da viabilidade espermática desta biotécnica (CARNEIRO, 2002). Segundo ROCA et al. (2000), o uso efetivo de sêmen resfriado para inseminação artificial depende da habilidade do diluidor em promover um ambiente apropriado para o espermatozóide durante sua conservação.

A conservação do sêmen por períodos curtos depende da redução reversível da motilidade e da atividade metabólica dos espermatozóides a temperaturas reduzidas (5°C ou 15°C) ou em dióxido de carbono (EVANS e

MAXWELL, 1990; MAXWELL e SALAMON, 1993; MACHADO e SIMPLÍCIO, 1995). Porém, a estocagem do sêmen refrigerado em diluidores à base de citrato-gema ou leite desnatado não deve exceder oito horas, pois a partir deste momento mais de 50% da motilidade é perdida (SAHNI, 1987) e a capacidade fecundante do sêmen resfriado decresce geometricamente. Apesar disso, MATHEW et al. (1982) preservaram sêmen caprino em pH neutro a uma temperatura de 5°C, por até dez dias, em diluente à base de Tris, acrescido de 20 ou 25% de gema de ovo.

Segundo EVANS e MAXWELL (1990), o período máximo de conservação do sêmen a 5°C, para obtenção de um grau aceitável de fertilidade através da inseminação artificial, é de 24 horas para ovinos e de 48 horas para caprinos. Já em temperaturas de 15°C, tanto o sêmen de ovinos como o de caprinos deve ser utilizado dentro de seis a 12 horas após a conservação, em diluidores à base de leite desnatado.

A capacidade fertilizante do espermatozóide ovino é mantida por mais de 14 dias em diluidor Tris-citrato a 5°C (STOJANOV et al., 1994, citados por MAXWELL e WATSON, 1996). Há relatos de que o sêmen ovino, assim como o de touros, pode ser conservado durante curto tempo em ambiente de dióxido de carbono (CO₂) entre 18 a 20°C (EVANS e MAXWELL, 1990).

Testes de determinação da motilidade progressiva individual e a porcentagem de espermatozoides móveis após 2, 4, 6, 8 e 24 horas de incubação a 15°C nos diluidores água de coco e leite, mostraram valores superiores para os espermatozoides conservados no diluidor água de coco (NUNES e COMBARNOUS, 1995).

2.3 Diluidores empregados na conservação do sêmen

O sucesso da inseminação artificial, particularmente em bovinos, caprinos e ovinos, depende grandemente do desenvolvimento de diluidores de sêmen satisfatórios (BEARDEN e FUQUAY, 1997), ou seja, que prolonguem a

sobrevivência das células espermáticas, permitindo desta forma, seu emprego em longas distâncias, ou seja, prolongando seu tempo de uso e mantendo bons índices de fertilidade.

No entanto, o sucesso da conservação de espermatozóides a longo prazo depende da diluição do sêmen com um meio contendo crioprotetores para proteger as células do estresse associado com a congelação e a descongelação. E até mesmo na presença de crioprotetores como glicerol e gema de ovo, o processo de congelação-descongelação causa danos às membranas plasmáticas dos espermatozóides, reduzindo sua motilidade e sua capacidade fecundante (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1997).

Os diluidores utilizados para congelar o sêmen de ovinos e caprinos devem ter propriedades semelhantes às dos diluidores utilizados para sêmen fresco, porém devem estar tamponados com Tris ou citrato, contra as mudanças de pH e tonicidade e conter uma fonte de energia (glicose ou frutose). Além disso, devem conter uma substância (normalmente gema de ovo) para proteger a membrana celular durante o resfriamento a 5°C e um agente crioprotetor (glicerol) para evitar lesões da membrana durante a congelação (EVANS e MAXWELL, 1990). Vários diluidores têm sido pesquisados para a congelação do sêmen caprino, como leite de vaca desnatado, citrato-glicose-gema, lactose-gema, sacarose-glicose-tris EDTA-gema, rafinose-gema, Spermasol-gema, IVT-gema, tris-gema e teste-gema (LEBOEUF et al., 2000).

Para o resfriamento de sêmen caprino e ovino, o diluidor empregado pode ser gema de ovo-tris-frutose, gema de ovo-glicose-citrato ou leite de vaca (leite integral aquecido, leite em pó reconstituído ou leite UHT). Para evitar o crescimento microbiano, tanto no resfriamento quanto na congelação de sêmen, devem ser adicionadas 1000 UI de penicilina sódica e 1 mg de sulfato de estreptomicina, por cada mililitro de diluidor (EVANS e MAXWELL, 1990). Os meios diluidores glicina-gema, glicina-gema-leite e gema-leite foram testados e mostraram ser eficientes na preservação do sêmen ovino por até 48 horas a 5°C, além de manterem a qualidade espermática de forma semelhante durante o teste de exaustão a 37°C por 240 minutos (PAGANINI FILHO et al., 1997).

O leite é um meio biológico de composição complexa, composto de proteínas, sais, glicídios, lipídios, vitaminas, etc. (VIEIRA DE SÁ, 1990). O pH em torno de 7,0 e a pressão osmótica em torno de 300 mOsm são próximos aos valores do sêmen (HAFEZ, 1993). O leite integral, desnatado ou reconstituído tem sido utilizado por muitos anos como diluidores para sêmen ovino. O sucesso deste diluente tem sido atribuído à sua fração protéica, que pode atuar como um tampão contra mudanças no pH e como um agente anti-oxidante contra qualquer metal pesado presente. Ele também pode proteger parcialmente o espermatozóide durante a redução da temperatura de estocagem (JONES, 1969; SALAMON e MAXWELL, 2000). ARAÚJO (2000) mostrou que a utilização de um diluidor misto, denominado BEL24, contendo gema de ovo e leite melhorou significativamente a fertilidade (superior a 50%) de ovelhas inseminadas com sêmen resfriado a 4 °C por 24 horas.

Na década de 70, o Tris foi muito utilizado como diluidor do sêmen ovino. A utilização deste como componente básico do diluidor para a congelação de sêmen foi realizada pela primeira vez por SALAMON e VISSER (1972). O diluidor Tris-frutose foi utilizado pela primeira vez em duas etapas de congelação pelo método de FISER et al. (1981). Este também tem sido incluído como componente em outros diluidores à base de lactose e sacarose. O diluidor Tris-glicose é amplamente utilizado e recomendado para a conservação do sêmen ovino (SALAMON, 1976; EVANS e MAXWELL, 1990).

2.4 Constituição dos diluidores

Segundo MIES FILHO (1987), independente da espécie animal, um bom diluidor deve apresentar as seguintes características: ausência de toxicidade, osmolaridade igual ou próxima à do sêmen, pH favorável segundo à espécie, preparação simples e baixo custo. Além disso, deve conter substâncias nutritivas e crioprotetoras para assegurar a sobrevivência dos espermatozoides.

Os diluidores que demonstram inequívoca eficiência têm em sua composição um sistema tampão (citrato, Tris, Tes, Hepes, Mop, Mes); um fator

protéico de crioproteção (à base de gema de ovo ou leite); diversos açúcares (monossacarídeos como glicose, manose, frutose ou dissacarídeos como a sacarose e a lactose) e diversos aditivos a exemplo de antioxidantes e glicina (SALAMON e MAXWELL, 2000).

A adição de fosfolipídios e lipoproteínas ao sêmen pode ter efeito estabilizador sobre a membrana (DEN DAAS, 1992). Essencialmente, o efeito parece ser o resultado de modificações na composição lipídica da membrana. Na maioria dos diluidores, usa-se gema de ovo ou leite como componente básico, uma vez que a proteção dos espermatozóides contra o choque térmico é provida pela fosfatidilcolina (lecitinas) e lipoproteínas da gema e pela caseína do leite (DEN DAAS, 1992).

2.4.1 Gema de ovo

O componente gema de ovo, além de promover a proteção contra o choque térmico, tem demonstrado reduzir a perda de enzimas acrossomais e prevenir alterações degenerativas no acrossoma, durante a estocagem líquida, ou seja, resfriamento (SALAMON e MAXWELL, 2000).

A gema de ovo é utilizada para proteger as membranas espermáticas do choque térmico. Por isso, é um constituinte comum dos diluidores utilizados na preservação do espermatozóide de mamíferos a baixas temperaturas (ROCA et al., 1997). No entanto, a estocagem do sêmen caprino em diluidores contendo gema de ovo é problemática devido à presença de fosfolipase A, produzida pelas glândulas de Cowper, que cataliza a hidrólise de lecitinas neste constituinte, produzindo ácidos graxos e lisolecitinas, que são tóxicas para o espermatozóide (ROY, 1957). A lisolecitina é tóxica devido a sua ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática (NUNES, 1982).

ROY (1957) relatou a ação do plasma seminal de caprinos sobre os elementos dos diluidores, no caso, a gema de ovo, mesmo estando a baixas concentrações como 2,5%. Portanto, a remoção do plasma seminal é recomendada

quando os espermatozóides caprinos são conservados a baixas temperaturas em diluidores contendo gema de ovo (CORTEEL, 1992).

ROCA et al. (2000) relataram que a remoção do plasma seminal em caprinos, pela lavagem do sêmen imediatamente após a colheita, aumentou a porcentagem de células vivas e sua motilidade durante conservação a 5°C em diluidores contendo gema de ovo ou leite. Em garanhões, verificou-se que a centrifugação e remoção parcial do plasma seminal antes do resfriamento é benéfica, isto é, melhora a viabilidade espermática, principalmente se o sêmen for conservado por mais de 24 horas (BRINSKO et al., 2000). Em búfalos também foi observado este mesmo comportamento em incubação a 37°C (AHMAD et al., 1996).

Já foi demonstrado que a adição de gema de ovo ao diluidor teve efeito benéfico sobre a porcentagem de espermatozóides móveis no sêmen ovino, principalmente após rápido resfriamento a 10 e 5°C (FISER e FAIRFULL, 1986). Alguns estudos indicaram que a fração lipoprotéica de baixa densidade da gema de ovo foi a fonte comum de proteção do espermatozóide ovino contra os efeitos do armazenamento a 5°C (WATSON e MARTIN, 1975).

Uma grande taxa de concentração de gema de ovo tem sido testada em diluidores para a congelação do sêmen ovino. Os trabalhos iniciais utilizaram 30 a 50%, mas subseqüentemente, os pesquisadores incluíram uma taxa mais baixa de concentração do diluidor (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Apesar dessa ação crioprotetora, baixas taxas de fertilidade com a inseminação cervical foram obtidas com a maioria dos diluidores contendo gema de ovo utilizada para a conservação do sêmen ovino após 24 horas (WATSON e MARTIN, 1976).

2.4.2 Glicerol

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$), um álcool polihídrico altamente permeável, cuja atividade crioprotetora foi descoberta em 1949 (POLGE et al., 1949), é o agente

mais largamente empregado na criopreservação de sêmen das diferentes espécies (SILVA et al., 2000). A habilidade do glicerol na transposição da membrana celular permite a desidratação da célula, através da saída de água por osmose (HAMMERSTEDT et al., 1990), evitando a formação de cristais de gelo que poderão promover a ruptura da membrana plasmática do espermatozóide.

SOUZA et al. (2002) relataram que diversos autores têm utilizado vários crioprotetores intracelulares, como o glicerol, em concentrações variáveis, obtendo resultados divergentes quanto à viabilidade espermática pós-descongelação. Segundo CARDOSO et al. (2003), o diluidor à base de água de coco acrescido de 20% de gema de ovo e 4, 6 ou 8% de glicerol pode ser utilizado com sucesso na criopreservação do sêmen canino. A utilização do glicerol a 7,0%, na criopreservação do sêmen caprino, foi mais eficiente quando comparado ao etilenoglicol na mesma concentração, ao serem avaliados *in vitro* (SOUZA et al., 2002).

O modo de ação do glicerol é aumentar a quantidade de líquido que se mantém descongelado no meio externo à célula espermática. Aparentemente, uma quantidade maior de células espermáticas sobrevive melhor com a ação desses canais de líquido extracelular descongelado (CARNEIRO, 2002). Apesar disto, a reduzida motilidade e fertilidade do sêmen congelado-descongelado comparada com a do sêmen fresco tem sido atribuída à citotoxicidade de crioprotetores como o glicerol (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1997).

2.5 Água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos

Em 1942, VAN OVERBECK (citado por PRETOV, 1968) observou pela primeira vez que a água de coco contém substâncias que induzem a diferenciação das células vegetais, tirando-as de seu estágio de dormência. Segundo PREVOT (1968) o princípio ativo da água de coco contém uma substância com propriedades semelhantes às auxinas e citocininas, que regulam o crescimento vegetal e induzem a divisão celular em plantas, fungos, algas e alguns protozoários. LETHAM (1974) identificou a fenilanina, substância que auxilia a passagem de líquidos através da

membrana celular. FERRI (1979) cita que os extratos e sucos de várias plantas apresentam atividades típicas de divisão celular e considera água de coco o mais importante por conter fatores necessários a crescimento de tecidos em cultivo.

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas e gorduras neutras (MARQUES, 1982). A água proveniente de um coco com seis meses de idade e de variedade verde apresenta osmolaridade em torno de 500 milliosmoles e pH entre 4,5 e 5, que devem ser corrigidos para que possa ser usada como diluidor (NUNES, 1987).

Dentre as opções de diluidores pobres em fosfolipídios, surgiu a água de coco que, através de experimentos *in vitro* e *in vivo*, mostrou um excelente comportamento no que se refere ao vigor e à motilidade de espermatozóides móveis e fertilidade (NUNES, 1986). Segundo NUNES e COMBARNOUS (1995), a água de coco é pobre em fosfolipídios e rica em moléculas orgânicas como a prolina, glicina, ácido glutâmico e ácido indol acético (IAA) que favorecem a sobrevivência da célula espermática devido a sua provável ação protetora sobre a membrana plasmática, reforçando sua estrutura molecular.

A água de coco tem sido muito utilizada em biotécnicas relacionadas à reprodução animal. Excelentes resultados foram obtidos com a utilização da água de coco *in natura* em estudos de preservação de sêmen de animais domésticos como caprinos (FREITAS, 1988; TONIOLLI, 1989a; RODRIGUES et al., 1994; NUNES, 1998), ovinos (FREITAS, 1992; CRUZ, 1994), suínos (TONIOLLI, 1989b; TONIOLLI e MESQUITA, 1990) e caninos (SILVA et al., 1998). De acordo com NUNES (1986, 1987), a fertilidade de cabras inseminadas com sêmen diluído em água de coco é superior àquela do leite. CAMPOS et al. (2001) verificaram que a associação da água de coco com o leite, teve uma composição favorável, visto que este procedimento melhorou a termorresistência dos espermatozóides em relação ao uso do leite isolado.

Visando isolar a fração que atua sobre os espermatozóides, NUNES et al. (1994) promoveram o fracionamento da água de coco, utilizando uma coluna de Sephadex G-25. Através deste procedimento foi isolada uma molécula

correspondente ao grupo das auxinas, o ácido 3-Indol-Acético (IAA), substância com atividade hormonal estimuladora de crescimento de vegetais, a qual demonstrou atividade sobre o metabolismo do espermatozóide. A adição do IAA na composição dos diluentes convencionais de sêmen de diferentes espécies, confere aos espermatozóides um incremento na motilidade e na taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais longos (NUNES, 1982; TONIOLLI et al., 1995).

CRUZ (1994) obteve uma fertilidade significativamente superior com o uso de sêmen preservado por 48 horas a 4°C, em meio contendo a molécula ativa da água de coco (40,74%), quando comparado com sêmen em meio à base de leite (14,81%). Devido aos excelentes resultados obtidos nos primeiros estudos com a água de coco *in natura* e com o objetivo de facilitar sua aplicação no campo, foi procedida a sua estabilização em forma de gel (NUNES, 1986). A estabilização da água de coco, tanto na forma líquida como na de gel, além de facilitar seu emprego, promoveria sua difusão em trabalhos de inseminação artificial, tornando-se fundamental no processamento do sêmen caprino (NUNES, 1988a).

LAGUNA (1996) relatou que a água de coco poderia sofrer alterações em sua composição, de acordo com o estágio de maturação do fruto ou referente à variedade da planta. Porém, CAMPOS (1999) demonstrou que não houve diferença estatística entre os frutos da variedade verde e amarela e que sua idade (três a seis meses) não afetou a qualidade da água de coco para diluição do sêmen caprino.

Atualmente, vem sendo pesquisado o uso da água de coco em pó (ACP), oriunda da secagem da água de coco *in natura* em aparelho denominado "Spray Dryer", através de um processo denominado nebulização/atomização. SALGUEIRO et al. (2002) inseminaram artificialmente 20 cabras do tipo SRD com diluidores à base de água de coco *in natura* (ACIN) e em pó (ACP-101) e detectaram um total de 15 cabras prenhes (75%). Destas, 7 (63,63%) foram inseminadas com ACN e 8 (88,89%) com ACP-101. SAMPAIO NETO et al. (2002), ao compararem dois diluidores (um à base de leite desnatado e outro à base de água de coco em pó) para refrigeração do sêmen eqüino, não verificaram diferenças significativas entre os

tratamentos, para os valores de motilidade total e progressiva, teste hiposmótico e porcentagem de células normais.

Segundo BRAZ (2003), os diluidores ACP e leite desnatado, na temperatura de 4°C, independente do tempo de conservação (2 ou 24 horas), mostraram desempenho *in vitro* semelhante na preservação dos parâmetros de motilidade e vigor espermático.

2.6 Inseminação artificial

Uma das principais biotécnicas da reprodução utilizadas é a inseminação artificial (IA), considerada uma das mais valiosas práticas de manejo reprodutivo disponível aos criadores (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1990). A IA é o ato de introduzir, por meios instrumentais, o sêmen nas vias genitais da fêmea em condições tais que permitam aos espermatozóides encontrar o óvulo e fecundá-lo (SANTOS et al., 1999). Pode ser realizada por via transcervical, por laparotomia ou laparoscopia, utilizando-se sêmen fresco, resfriado ou congelado.

Embora os conhecimentos sobre IA remontem ao século XVIII, somente no século XX a prática passou a ser realizada como uma maneira de se conseguir a multiplicação de descendentes de determinado reprodutor ou como método eficaz de se obter, com maior rapidez, a melhoria genética dos rebanhos (NUNES et al., 1997; NUNES e FERNÁNDEZ, 2001).

Esta técnica tem uma importante função na reprodução caprina, especialmente em sistemas intensivos de produção, que é a reprodução controlada com o conseqüente melhoramento da produção de leite, carne e pele (LEBOEUF et al., 2000). Outras vantagens oferecidas por essa técnica são: redução ou eliminação da presença de reprodutores na propriedade, reduzindo custos de manutenção do rebanho; possibilidade de pequenos produtores adquirirem sêmen de reprodutores de alto valor genético, o que de outra forma não seria possível devido ao baixo poder aquisitivo para comprar ou manter um animal de elite; prevenção de doenças, quando o reprodutor é testado e/ou o sêmen é tratado com antibióticos; e utilização

de reprodutores que já morreram ou estão impossibilitados de realizar a monta (SANTOS et al., 1999).

Muitos fatores podem afetar a fertilidade durante o processo de inseminação artificial, reduzindo a taxa de fertilidade: o escore corporal dos animais, a composição dos diluidores, o processo de resfriamento (BYNE et al., 2000), o tempo ótimo para a realização da inseminação artificial, a dose inseminante (FERNANDEZ-ABELLA et al., 2003) e o método de inseminação utilizado (laparotomia, laparoscopia, transcervical, vaginal) (SANCHÉZ - PARTIDA et al., 1999).

A inseminação artificial cervical ainda não tem sido adotada comercialmente em ovinos de países desenvolvidos, pois geralmente se utiliza o sêmen congelado, o que resulta em uma baixa fertilidade. A inseminação intra-uterina por laparoscopia supera a barreira cervical, resultando em uma aceitável fertilidade, entretanto, ela não é utilizada na produção industrial devido ao elevado custo para realização, além dos gastos com equipamentos e drogas. Um método modificado de inseminação intra-uterina, a transcervical, obtém uma fertilidade semelhante à da inseminação artificial laparoscópica (HALBERT et al., 1990; BUCKRELL et al., 1992), além disso, este método reduz o custo da inseminação intra-uterina.

Na inseminação cervical, um volume reduzido (0,25 mL) e uma concentração elevada de espermatozóides são requeridos para a obtenção de resultados satisfatórios de fertilidade (ALLINSON e ROBINSON, 1971). O desenvolvimento da tecnologia de criopreservação dos espermatozóides da espécie ovina teve um considerável progresso prático e econômico na aplicação da IA em condições de campo (ALESSANDRO et al., 2001).

A dificuldade de ultrapassar a cérvix é um dos limites da inseminação artificial cervical e transcervical em ovelhas. O trauma causado pelos instrumentos utilizados para ultrapassar a cérvix pode reduzir a fertilidade após inseminação artificial (MEGHAN et al., 2002). Recentemente, o desenvolvimento de técnicas de inseminação artificial tem realizado a deposição intra-uterina do sêmen, após ultrapassar os anéis cervicais na espécie ovina. Entretanto, o nascimento de

cordeiros só foi obtido até o presente momento após a inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia (SALAMON e MAXWELL, 1995).

A taxa de fertilidade após inseminação artificial cervical utilizando sêmen fresco e congelado é de 32% e 11,3%, respectivamente (SANCHÉZ – PARTIDA et al., 1999). Um dos grandes entraves da inseminação artificial cervical é a manutenção da motilidade espermática após a congelação do sêmen, o que o torna capaz de ultrapassar todo o trato genital feminino e alcançar o local da fecundação (EVANS, 1988).

3 JUSTIFICATIVA

O resfriamento do sêmen ovino é um problema até então não solucionado, no que se refere a um maior tempo de conservação e na obtenção de taxas de prenhez satisfatórias em ovelhas inseminadas com sêmen assim tratado, pois as modificações que ocorrem após o tratamento *in vitro* acarretam variações no metabolismo e/ou sobrevivência espermática.

A viabilidade e um maior tempo de sobrevivência dos espermatozóides da espécie ovina requerem prioridade na busca de diluidores que permitam uma maior proteção das células espermáticas. Neste contexto, encontra-se a água de coco que tem demonstrado exercer ação benéfica sobre os espermatozóides de vários mamíferos domésticos.

A água de coco, por ser um produto oriundo de vegetações tipicamente tropicais, tem a sua difusão limitada em trabalhos que visem à preservação do sêmen de animais em regiões de clima temperado. Neste sentido, a utilização da água de coco na forma de pó facilitaria o seu emprego, bem como sua difusão para regiões que não disponham deste fruto. Excelentes resultados foram obtidos em estudos empregando-se a água de coco em pó para a diluição do sêmen caprino (SALGUEIRO et al., 2002), ovino (MACHADO et al., 2002; MACHADO, 2003) e eqüino (SAMPAIO NETO et al., 2002).

Em programas de inseminação artificial realizados para a espécie ovina, especialmente no Nordeste do Brasil, a influência das épocas chuvosa e seca pode causar variações nos aspectos quanti-qualitativos do sêmen. Desta forma, torna-se necessária a elaboração de diluidores para o resfriamento do sêmen ovino, bem como o conhecimento do comportamento fisiológico do espermatozóide por meio de sua avaliação nas condições climáticas da região Nordeste.

4 HIPÓTESES

1- A água de coco padronizada e estabilizada sob a forma de pó pode oferecer um produto de melhor qualidade, contribuindo assim, para a melhoria da viabilidade *in vitro* e *in vivo* do sêmen ovino resfriado;

2- O diluidor água de coco em pó (ACP-102[®]) pode ser utilizado para o resfriamento do sêmen ovino sem necessidade da adição do crioprotetor gema de ovo;

3- A época do ano, no Estado do Ceará, pode ter influência sobre a qualidade do sêmen ovino resfriado.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* e *in vivo* o sêmen ovino em diluidores à base de água de coco, após resfriamento, nas épocas chuvosa e seca no Estado do Ceará.

5.2 Objetivos específicos

- Comparar a qualidade *in vitro* do sêmen ovino diluído em água de coco *in natura* e em pó (ACP-102), após resfriamento a 4°C por até 48 horas, por meio do teste de termorresistência, durante as épocas chuvosa e seca;
- Verificar a influência da gema do ovo na conservação do sêmen ovino coletado nas épocas chuvosa e seca e diluído em água de coco *in natura* ou em pó (ACP-102), resfriado a 4°C por até 48 horas;
- Avaliar a morfologia espermática após a diluição do sêmen em água de coco *in natura* ou em pó (ACP-102) por meio de microscopia óptica, durante as épocas chuvosa e seca;
- Inseminar e comparar a fertilidade de ovelhas, nas épocas chuvosa e seca, com sêmen diluído em água de coco *in natura* ou em pó (ACP-102) e resfriado por 24 horas.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Experimento *in vitro*

6.1.1 Local de execução

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO) da Universidade Estadual do Ceará, em Fortaleza – CE, que está situada em uma planície litorânea a 3°45'47" de latitude sul e 38°31'23" de longitude oeste, com temperatura média anual de 27 °C.

6.1.2 Diluidores

Foram testados quatro diluidores:

- Água de coco *in natura* com gema (ACING)
- Água de coco *in natura* sem gema (ACIN)
- ACP-102 com gema (ACPG)
- ACP-102 sem gema (ACP)

Cada diluidor foi elaborado conforme protocolo a seguir: ACIN - 50 mL de água de coco *in natura* filtrada + 50 mL de solução de citrato de sódio a 2,5%; ACP - ACP-102 tamponado (6g) + 100 mL de água destilada. Os diluidores ACING e ACPG foram elaborados de acordo com o protocolo descrito para ACIN e ACP respectivamente, no entanto foram retirados 3,0% do volume total dos diluidores e acrescentada a mesma quantidade de gema de ovo.

6.1.3 Água de coco em pó (ACP-102)

A água de coco *in natura* foi proveniente de frutos da variedade anão verde, com aproximadamente seis meses de frutificação. A secagem da água de

coco *in natura* para elaboração da água de coco em pó (ACP-102) foi efetuada em aparelho “Spray Dryer”, modelo DL-41, pertencente ao Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC), da Universidade Federal do Ceará (UFC). O produto foi vaporizado por um processo denominado nebulização / atomização, visando reduzi-lo à pequeníssimas gotas, por meio de atomizador.

6.1.4 Animais experimentais e colheita de sêmen

Foram utilizados quatro machos ovinos da raça Santa Inês, com idade média de um ano, submetidos ao regime de manejo intensivo de criação. Os animais foram mantidos em baias de alvenaria individuais, recebendo no cocho, 500g de concentrado, capim-elefante picado, feno de tifton, sal mineral e água à vontade. O sêmen dos reprodutores foi colhido pela manhã, por meio de vagina artificial, uma vez por semana nas épocas chuvosa (fevereiro a abril) e seca (outubro a dezembro), durante dois anos consecutivos, perfazendo um total de 48 ejaculados por época. Após a colheita, cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume (mL), motilidade massal (escore de 0-5) e concentração espermática ($\times 10^9$ sptz/mL).

6.1.5 Resfriamento do sêmen

Após a avaliação, o sêmen de cada reprodutor foi dividido em quatro alíquotas, que foram diluídas em ACIN, ACING, ACP e ACPG, previamente aquecidos a 37°C em banho-maria. Em seguida, os tubos de ensaio contendo as amostras foram acondicionados em geladeira, dentro de beakers contendo água do banho-maria (a 37°C) até que a temperatura atingisse 4°C.

6.1.6 Teste de termorresistência

Amostras do sêmen resfriado foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR) em banho-maria a 37°C e avaliadas quanto ao vigor (VIG) e motilidade (MOT) aos 5, 60 e 120 minutos de incubação. Estas avaliações foram realizadas após 2, 24 e 48h de resfriamento. A taxa de degradação da motilidade

(TDM) foi calculada ao final de cada TTR e tempo de resfriamento, pela seguinte fórmula:

$$\text{TDM} = \frac{\text{VIG 5 min} - \text{VIG 120 min}}{\text{VIG 5 min}} \times 100$$

6.1.7 Avaliação da morfologia espermática

Para análise da porcentagem de alterações morfológicas, esfregaços de sêmen foram realizados aos 5 e 120 minutos de incubação e corados com uma solução à base de eosina 1%, nigrosina 3% e citrato de sódio 3%, onde foram observadas 200 células por meio de microscopia óptica no aumento de 1000X. As anormalidades foram classificadas segundo COLAS (1980) em: anormalidade de cabeça (AC), defeito de peça intermediária (DPI), gota citoplasmática proximal (GCP), gota citoplasmática distal (GCD) e anormalidade de flagelo (AF).

6.1.8 Análise estatística

Os parâmetros de vigor, motilidade, taxa de degradação da motilidade e morfologia espermática foram expressos em média e desvio padrão e avaliados pela ANOVA utilizando-se o modelo GLM (General Linear Model). As variáveis independentes utilizadas foram: tempo de conservação (2, 24 e 48h), tipo de diluidor (ACPG, ACP, ACING e ACIN) e época do ano (chuvosa e seca).

Em seguida, foram submetidos ao teste Tukey utilizando-se um delineamento em parcelas subdivididas (comparações triplas). Foi utilizado um nível de significância de 5%. Os ejaculados foram considerados repetições para cada tempo de conservação e diluidor testado (The SAS System, 8.0).

6.2 Experimento *in vivo*

6.2.1 Local de execução

O experimento foi conduzido em propriedade particular situada no município de Boa Viagem-CE, localizado na microrregião do sertão de Quixeramobim, possuindo as coordenadas geográficas: 05°13'18,6" de latitude sul e 39°48'19,4" de longitude oeste, com temperatura média anual entre 25 °C e 35 °C.

6.2.2 Animais experimentais e tratamento hormonal

Foram utilizadas 120 ovelhas mestiças de Santa Inês na época seca e 94 na época chuvosa, com idade média de três anos e submetidas a manejo semi-intensivo. Estas fêmeas foram previamente submetidas a tratamento hormonal, através da colocação de esponjas intravaginais impregnadas com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), que permaneceram durante 14 dias na porção cranial da vagina. No dia da retirada das esponjas foram administradas por via intramuscular 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG).

6.2.3 Lotes experimentais

As ovelhas foram distribuídas em dois lotes experimentais compostos por 50% de ovelhas cada, de acordo com o tipo de diluidor de sêmen utilizado para a inseminação artificial: lote A (ACIN) e lote B (ACP). Durante a época seca, foram perdidas seis fêmeas do experimento, resultando num total de 114 ovelhas (60 foram inseminadas com ACIN e 54 com ACP).

6.2.4 Colheita e diluição do sêmen

Em cada época estudada, o sêmen de dois carneiros da raça Santa Inês, previamente selecionados para as inseminações, foi colhido, pela manhã, por meio

de vagina artificial e submetido à avaliação do volume (mL), motilidade massal (escore 0 a 5) e concentração espermática ($\times 10^9$ sptz/mL). Após o pool foi dividido em duas alíquotas, as quais foram diluídas em ACIN (50 mL de água de coco *in natura* filtrada + 50 mL de solução de citrato de sódio a 2,5%) e em ACP (ACP-102 tamponado + 100 mL de água destilada) e finalmente resfriadas a 4 °C por 24 horas.

6.2.5 Inseminação artificial

O sêmen previamente resfriado foi transportado ao local da inseminação em recipiente térmico, sendo envasado em palhetas de 0,50 mL, contendo uma concentração de 200 milhões de espermatozóides por dose. Todas as ovelhas foram inseminadas por via cervical, independente do aparecimento do estro, entre 50 e 55 horas após a retirada das esponjas.

6.2.6 Diagnóstico de gestação

Para o diagnóstico de gestação, foi utilizado um aparelho de ultrassom Pie Medical LC Vet 100 com transdutor linear de 6-8 MHz por via transretal, 50 dias após as inseminações.

6.2.7 Análise estatística

A taxa de fertilidade foi comparada entre os dois tratamentos (ACIN e ACP) e as duas épocas (chuvosa e seca) e analisada através do teste do Qui-quadrado, estimando-se a média e o desvio padrão com nível de significância de 5% de probabilidade (The SAS System, 8.0).

7 RESULTADOS

7.1 Experimento *in vitro*

Os resultados de vigor (VIG), motilidade (MOT), taxa de degradação da motilidade (TDM) e morfologia espermática (ME) do sêmen ovino resfriado por até 48 horas, nos diluidores e épocas testadas durante o teste de termorresistência, são mostrados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Quanto aos diluidores (TABELA 1), foram realizadas comparações entre:

- a) Mesmo diluidor, sendo um com gema de ovo e o outro sem este crioprotetor - ACING X ACIN e ACPG X ACP;
- b) Diluidores diferentes, sendo ambos com ou sem gema de ovo - ACING X ACPG e ACIN X ACP.

Com relação à adição da gema de ovo, foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) nos valores de MOT entre os diluidores testados durante todo o tempo de resfriamento, tanto na época chuvosa quanto na seca. Já o VIG, apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os diluidores ACING e ACIN, assim como entre os diluidores ACING e ACPG, resfriados por 2 e 24 horas na época seca. Resultados superiores foram observados no diluidor ACING (4,08 e 3,76), quando comparado com ACIN (3,66 e 3,32) e com ACPG (3,65 e 3,22), após 2 e 24 horas, respectivamente.

Quando comparados os três tempos de resfriamento (2, 24 e 48 horas), independente da época e do diluidor testado, foi possível verificar uma queda gradativa no vigor e na motilidade espermática ($P < 0,05$). Durante a época chuvosa, os valores de motilidade e vigor apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre 2 e 48 horas de resfriamento. Já na época seca, este comportamento foi observado nos diluidores ACIN e ACP, com relação ao VIG. No diluidor ACING, o VIG diferiu ($P < 0,05$) a partir de 24 horas de resfriamento e no diluidor ACPG diferiu entre 2 e 24 horas e entre 2 e 48 horas.

TABELA 1 - Vigor e motilidade do sêmen ovino diluído em água de coco *in natura* com e sem gema (ACING e ACIN) e ACP-102 com e sem gema (ACPG e ACP) e resfriado por até 48 horas, durante as épocas chuvosa e seca no Estado do Ceará.

Épocas	Diluidores	Tempos de Resfriamento					
		VIG			MOT (%)		
		2 h	24 h	48 h	2 h	24 h	48 h
Chuvosa	ACING	4,10 ± 0,44 ¹	3,82 ± 0,57 ^{1,2}	3,42 ± 0,53 ²	70,15 ± 16,02 ^{A1}	61,87 ± 15,95 ^{A1,2}	54,40 ± 15,08 ^{A2}
	ACIN	3,84 ± 0,55 ¹	3,58 ± 0,64 ^{1,2}	3,22 ± 0,61 ²	50,81 ± 12,39 ^{B1}	44,16 ± 12,28 ^{B1,2}	37,67 ± 11,92 ^{B2}
	ACPG	3,81 ± 0,58 ¹	3,60 ± 0,56 ^{1,2}	3,27 ± 0,60 ^{a2}	63,15 ± 15,11 ^{bA1}	54,84 ± 14,38 ^{bA1,2}	47,74 ± 12,53 ^{A2}
	ACP	3,68 ± 0,57 ¹	3,35 ± 0,69 ^{1,2}	3,10 ± 0,67 ²	50,34 ± 13,25 ^{B1}	42,43 ± 12,27 ^{B1,2}	37,44 ± 11,73 ^{B2}
Seca	ACING	4,08 ± 0,48 ^{A1*}	3,76 ± 0,52 ^{A1*}	3,23 ± 0,78 ²	77,18 ± 14,87 ^{A1}	70,20 ± 15,43 ^{A1}	59,16 ± 19,24 ^{A2}
	ACIN	3,66 ± 0,61 ^{B1}	3,32 ± 0,65 ^{B1,2}	2,95 ± 0,73 ²	56,89 ± 17,69 ^{B1}	44,67 ± 14,57 ^{B2}	39,11 ± 14,83 ^{B2}
	ACPG	3,65 ± 0,46 ^{1**}	3,22 ± 0,67 ^{2,3**}	2,82 ± 0,87 ^{b3}	73,81 ± 13,62 ^{aA1}	63,92 ± 16,51 ^{aA2}	50,77 ± 19,94 ^{A3}
	ACP	3,62 ± 0,53 ¹	3,27 ± 0,61 ^{1,2}	2,95 ± 0,70 ²	56,97 ± 16,82 ^{B1}	45,97 ± 15,32 ^{B2}	39,84 ± 14,52 ^{B2}

^{a,b}letras diferentes, comparação entre as épocas chuvosa e seca (linhas) P<0,05;

^{A,B,C}letras diferentes, comparação entre o diluidor ACING x ACIN e o ACPG x ACP (P<0,05);

^{1,2,3}números diferentes, comparação entre o tempo de resfriamento (2, 24 e 48 h) P<0,05;

^{*,**}asteriscos diferentes, comparação entre diluidores ACING x ACPG e ACIN x ACP (P<0,05).

Ainda na época seca, observou-se que os valores de MOT diferiram significativamente ($P<0,05$) entre os três tempos de resfriamento no diluidor ACPG e que apresentou estabilidade até 24 horas, no diluidor ACING e a partir de 24 horas nos diluidores ACIN e ACP.

Foi verificada diferença significativa ($P<0,05$) entre as épocas com relação ao VIG, somente nas amostras diluídas em ACPG e resfriadas por 48 horas, com resultado superior obtido na época chuvosa. Os valores de MOT também só diferiram entre as épocas nas amostras diluídas em ACPG, porém resfriadas por 2 e 24 horas e neste caso, os resultados superiores foram obtidos na época seca.

Com relação à TDM (TABELA 2), verificou-se diferença significativa ($P<0,05$) entre as épocas chuvosa e seca nas amostras diluídas em ACPG, após 48 horas de resfriamento, sendo o maior valor da TDM ($19,56 \pm 25,47\%$) observado na época seca. Não foram observadas diferenças significativas entre os diluidores e tempos de resfriamento testados.

TABELA 2 - Taxa de degradação da motilidade (TDM) do sêmen ovino diluído em água de coco *in natura* com e sem gema (ACING e ACIN) e ACP-102 com e sem gema (ACPG e ACP) e resfriado por até 48 horas, durante as épocas chuvosa e seca no Estado do Ceará.

Épocas	Diluidores	TDM (%)		
		2 h	24 h	48 h
Chuvosa	ACING	$12,31 \pm 6,83$	$13,84 \pm 11,25$	$13,88 \pm 10,96$
	ACIN	$16,53 \pm 8,45$	$15,23 \pm 11,99$	$14,50 \pm 7,62$
	ACPG	$13,47 \pm 12,20$	$12,35 \pm 11,23$	$11,95 \pm 9,86^b$
	ACP	$16,31 \pm 14,95$	$16,50 \pm 16,58$	$16,13 \pm 13,28$
Seca	ACING	$14,61 \pm 9,14$	$14,70 \pm 9,11$	$19,41 \pm 20,54$
	ACIN	$18,95 \pm 15,06$	$17,07 \pm 14,41$	$21,28 \pm 16,91$
	ACPG	$13,83 \pm 8,73$	$13,92 \pm 15,95$	$19,56 \pm 25,47^a$
	ACP	$15,82 \pm 11,88$	$13,70 \pm 11,99$	$16,85 \pm 16,80$

^{a,b}letras diferentes, comparação entre as épocas chuvosa e seca (linhas) $P<0,05$;

Na morfologia espermática (TABELA 3), somente os valores da anormalidade de cabeça apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre as épocas do ano. Esta diferença foi observada no diluidor ACP resfriado por 2 horas e no diluidor ACPG resfriado por 48 horas. A época seca mostrou valores superiores ($9,53 \pm 5,75$ e $8,78 \pm 10,97$) aos da época chuvosa ($4,86 \pm 4,64$ e $4,47 \pm 3,78$) nos diluidores ACP e ACPG, respectivamente.

A maior porcentagem de anormalidades totais (12,34%) foi verificada no sêmen diluído em ACP resfriado por 48 horas e a menor (8,34%) no sêmen diluído em ACPG no início do resfriamento (2 horas), ambas observadas durante a época seca.

TABELA 3 - Morfologia do sêmen ovino diluído em água de coco *in natura* com e sem gema (ACING e ACIN) e ACP-102 com e sem gema (ACPG e ACP), resfriado por até 48 horas, após teste de termorresistência (TTR), durante as épocas chuvosa e seca no Estado do Ceará.

Tempos de Resfriamento	Diluidor	Épocas do ano					
		Chuvosa			Seca		
		N	AC	AF	N	AC	AF
2 h	ACING	182,27 ± 14,97	4,86 ± 4,05	12,85 ± 15,33	182,93 ± 17,16	4,95 ± 4,30	12,10 ± 15,98
	ACIN	179,50 ± 15,82	7,12 ± 6,01	13,37 ± 15,51	178,24 ± 17,99	8,53 ± 5,99	13,21 ± 16,89
	ACPG	182,14 ± 15,89	4,23 ± 4,42	13,62 ± 15,80	183,31 ± 16,13	6,14 ± 5,49	10,54 ± 14,23
	ACP	179,98 ± 18,19	4,86 ± 4,64 ^b	15,15 ± 18,73	177,20 ± 17,78	9,53 ± 5,75 ^a	13,26 ± 16,52
24 h	ACING	181,21 ± 15,69	6,41 ± 9,39	12,36 ± 14,27	181,54 ± 16,63	5,97 ± 5,17	12,47 ± 15,67
	ACIN	178,27 ± 15,20	9,56 ± 10,71	12,15 ± 13,13	177,56 ± 17,82	9,41 ± 6,55	13,01 ± 16,41
	ACPG	181,15 ± 16,43	5,67 ± 8,94	13,17 ± 15,49	182,56 ± 15,66	6,64 ± 7,62	10,79 ± 12,82
	ACP	179,90 ± 16,43	6,86 ± 9,17	13,22 ± 15,61	176,05 ± 18,88	9,21 ± 5,83	14,72 ± 17,57
48 h	ACING	180,26 ± 14,78	4,43 ± 3,90	15,30 ± 15,02	179,96 ± 16,50	5,96 ± 5,41	14,07 ± 15,31
	ACIN	176,77 ± 15,45	7,71 ± 7,18	15,50 ± 15,59	177,57 ± 16,87	8,44 ± 6,99	13,98 ± 15,17
	ACPG	180,55 ± 15,76	4,47 ± 3,78 ^b	14,97 ± 15,81	179,18 ± 17,35	8,78 ± 10,97 ^a	12,03 ± 12,98
	ACP	177,08 ± 17,12	6,48 ± 6,35	16,42 ± 17,50	175,29 ± 18,54	9,70 ± 8,45	14,99 ± 15,77

^{a,b}letras diferentes, comparação entre as épocas chuvosa e seca (colunas) P<0,05.

N = n° de células normais; AC = n° de anormalidades de cabeça; AF = n° de anormalidades de flagelo

7.2 Experimento *in vivo*

As taxas de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen diluído em ACIN ou ACP e resfriado a 4 °C por 24 horas durante as épocas chuvosa e seca são apresentados na TABELA 4.

Nenhum dos dois diluidores (ACIN ou ACP) apresentou efeito significativo sobre os resultados da taxa de prenhez. O nível de significância para o efeito da época, está expresso na TABELA 4. Foi observada diferença significativa somente entre as épocas chuvosa e seca ($p = 0,003$).

Durante a época chuvosa a maior taxa de prenhez foi observada nas ovelhas inseminadas com o diluidor ACP, enquanto que na época seca a taxa de prenhez foi maior com a utilização do diluidor ACIN. Porém, a diferença não foi estatisticamente significativa. Foi observada maior taxa de prenhez durante a época seca (81,58%) quando comparada com a época chuvosa (63,83%), independentemente dos diluidores utilizados.

TABELA 4 - Taxas de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen diluído em água de coco *in natura* (ACIN) ou em ACP-102[®] (ACP) e resfriado a 4 °C por 24 horas durante a época chuvosa (n = 94) e seca (n = 114).

	Época chuvosa	Época seca
ACIN	61,70% (29/47)	85,00% (51/60)
ACP	65,96% (31/47)	77,78% (42/54)
Total	63,83% (60/94)**	81,58% (93/114)*

*, **Épocas chuvosa e seca diferiram ($\chi^2 = 8,34$; $p = 0,003$).

8 DISCUSSÃO

8.1 Experimento *in vitro*

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, constatou-se que a gema de ovo (TABELA 1) exerce ação benéfica quando adicionada aos diluidores água de coco *in natura* (ACIN) e ACP-102 (ACP), independente do tempo de resfriamento. A fração lipoprotéica de baixa densidade da gema de ovo é a fonte de proteção do espermatozóide ovino contra os efeitos do armazenamento a 5°C (WATSON e MARTIN, 1975; MOUSSA et al., 2002). Utilizando água de coco *in natura* adicionada de 2,5% de gema de ovo, para o resfriamento do sêmen ovino a 4°C, FIGUEIRÊDO et al. (2001) observaram que os espermatozoides ainda encontravam-se viáveis, mesmo após 72 horas de conservação.

Já foi demonstrado que a adição de gema de ovo ao diluidor teve efeito benéfico sobre a MOT do sêmen ovino (FISER e FAIRFULL, 1986), o que se confirmou neste estudo tanto na época chuvosa quanto na seca. Os diluidores utilizados neste estudo (ACIN e ACP), quando adicionados deste crioprotetor, apresentaram valores de MOT superiores aos dos mesmos diluidores sem gema.

Num estudo recente, BRAZ (2003) observou que o ACP-102[®] apresentou valores bem próximos aos do diluidor à base de leite com relação aos parâmetros de motilidade, ao resfriar o sêmen ovino por até 24 horas. O presente estudo confirmou que o diluidor ACP-102 apresenta boa capacidade conservadora, pois mostrou valores semelhantes aos observados no diluidor água de coco *in natura*, quando ambos foram utilizados sem adição do crioprotetor gema de ovo.

Verificou-se neste estudo (TABELA 1), que independente do diluidor utilizado, o processo de resfriamento causou significativa redução na qualidade espermática, conforme havia sido observado por MILCZEWSKI et al. (2000a). Segundo SALAMON e MAXWELL (1995), a diminuição e aumento na temperatura, assim como a manipulação do sêmen durante o processo de conservação,

promovem inevitavelmente, redução na motilidade e causam danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozóides.

Segundo BARIL et al., (1993) e o manual do CBRA (1998), dentre os demais padrões seminais, os valores desejáveis para a seleção de carneiros para a monta natural são: MOT = 70% e VIG = 3. Portanto, no presente trabalho, somente a média geral de VIG encontra-se de acordo com estas recomendações. No entanto, de acordo com MORAES (1997) o sêmen de ovinos aptos para a cobertura deve apresentar MOT > 50% e VIG > 2, estando a maioria dos resultados encontrada no presente estudo de acordo com esta recomendação, ou seja, comparáveis aos resultados observados com sêmen fresco.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho (TABELA 1), a época do ano teve influência sobre a qualidade do sêmen diluído em ACP-102 adicionado de gema de ovo. No entanto, não inviabilizou sua utilização, visto que à exceção do valor da MOT na época chuvosa após 48 horas de resfriamento, os valores do VIG e da MOT estavam dentro dos valores recomendados por MORAES (1997).

Com o objetivo de avaliar a sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês nas condições climáticas do Distrito Federal, MARTINS et al. (2003) não observaram variação da motilidade. Trabalhando com caprinos no Ceará, CAMPOS (2003) também obteve resultado semelhante. No presente estudo, nas condições do estado do Ceará, tanto o VIG quanto a MOT sofreram variações de acordo com a época do ano.

É bem conhecido que temperaturas elevadas exercem efeitos deletérios sobre a qualidade do sêmen, podendo produzir alterações como: elevação do pH e da porcentagem de espermatozóides anormais, diminuição da motilidade, da concentração espermática, do volume e da motilidade progressiva (CORTEEL, 1981). Ao contrário do que se esperava, neste estudo os valores da MOT foram superiores na época seca, quando a possibilidade dos animais sofrerem estresse devido ao calor é bem maior. Isso sugere que a suplementação alimentar fornecida neste período tenha melhorado as condições do metabolismo fisiológico, aliada à boa adaptação dos animais às condições do clima na época seca.

A época seca do ano teve influência negativa sobre a TDM (TABELA 2) no final do tempo de resfriamento (48h) do sêmen ovino diluído em ACPG. CAMPOS et al. (2004) também observaram efeito da época do ano sobre o sêmen caprino lavado após diluição em água de coco *in natura*, porém a maior TDM foi encontrada na época chuvosa. Não foram observadas diferenças significativas entre os diluidores e tempos de resfriamento testados neste estudo com relação à TDM, conforme foi também observado por FIGUEIRÊDO (2002), ao trabalhar com diluidores à base de água de coco para o resfriamento do sêmen caprino.

Com relação à morfologia espermática (TABELA 3), o diluidor utilizado, a época do ano e o tempo de resfriamento não exerceram efeito sobre o número de espermatozóides normais e com anormalidade de flagelo.

No presente estudo foram submetidas à análise estatística somente as anormalidades de cabeça (AC) e de flagelo (AF), pois as demais alterações na morfologia espermática como defeito de peça intermediária (DPI), gota citoplasmática proximal (GCP) e gota citoplasmática distal (GCD) foram consideradas mínimas para este fim.

Dentre as anormalidades espermáticas, somente o número de espermatozóides com anormalidade de cabeça apresentou aumento durante a época seca, após 2 e 48 horas de resfriamento, indicando um processo de desestabilização da estrutura das células espermáticas, enquanto que o número de anormalidades de flagelo manteve-se estável. MARTINS et al. (2003) observaram além de anormalidades de cabeça, anormalidades de peça intermediária, também durante a época seca. Este resultado diferiu do obtido por MILCZEWSKI et al. (2000a) que verificaram aumento na porcentagem de espermatozóides com anormalidade de flagelo no sêmen ovino resfriado por 8 horas a 5 °C.

Nenhuma das porcentagens de anormalidades espermáticas totais observadas no presente estudo ultrapassou o limite máximo de utilização do sêmen ovino, que segundo o manual do CBRA (1998) não deve ser superior a 20%. A maior porcentagem (12,34%) verificada no final do tempo de resfriamento (48 horas)

foi inferior à observada por. MILCZEWSKI et al. (2000a), no sêmen ovino fresco (12,9%).

Segundo COLAS (1980) e REGE et al. (2000), o total de espermatozóides normais é o melhor indicador do efeito da época do ano, pois este fator é muito correlacionado com o teste de fertilidade *in vivo*. Como a época do ano não exerceu efeito sobre o número de espermatozóides normais neste experimento, o sêmen colhido tanto na época chuvosa quanto na seca pode ser considerado satisfatório.

8.2 Experimento *in vivo*

Os vários diluidores utilizados para conservação do sêmen ovino resfriado a 4°C ou 15°C não permitem um tempo de armazenamento mais prolongado, sendo a sua utilização limitada a 8 horas para obtenção de boas taxas de fertilidade. Após 12 – 24 horas de armazenamento, o poder fecundante do espermatozóide ovino diminui (30% ou mais) e, conseqüentemente, a fertilidade após a inseminação artificial (MAXWELL e SALAMON, 1993).

No presente estudo, os resultados de prenhez das ovelhas para os dois diluidores testados (ACIN e ACP), independente da época, foram bastante satisfatórios, uma vez que as inseminações foram realizadas por via cervical e com sêmen resfriado a 4°C por 24 horas. Estes valores foram semelhantes aos obtidos por MILCZEWSKI et al. (2000b) por via intra-uterina (85,71% e 69,56%), uma vez que as taxas de prenhez obtidas por via cervical foram de 21,74% e 8,33%, utilizando os diluidores citrato-gema e Cornell University Extender, respectivamente, para o resfriamento do sêmen ovino a 5°C por 8 a 10 horas. MACHADO (2003), trabalhando com sêmen ovino resfriado a 4°C por no máximo 6 horas, obteve taxas de prenhez bem inferiores, de 25,8% com água de coco *in natura* e de 48% com água de coco em pó, após inseminações por via cervical.

No experimento *in vitro*, a média geral dos valores de VIG e MOT não diminuiu significativamente após 24 horas de conservação a 4°C, o que explica a excelente fertilidade *in vivo* com o sêmen também conservado por 24 horas.

A sincronização do estro implica no tratamento hormonal em ovelhas, o que pode ter um efeito negativo sobre a fertilidade (ANEL et al., 2005), porém no presente estudo, as ovelhas que tiveram o estro natural e sincronizado com hormônios obtiveram taxas de prenhez variando entre 61,70% e 85%. Estes resultados foram próximos aos verificados por DONOVAN et al. (2004), que não observaram diferença significativa em taxas de prenhez entre ovelhas inseminadas com sêmen fresco durante o estro natural (82%) e àquelas submetidas à sincronização (70%).

No presente trabalho, a dose inseminante foi de 200 milhões de espermatozóides em 0,50 mL, semelhante à utilizada por SOUSA (2002), que obteve médias de prenhez de 41,9% com sêmen fresco e 21,5% com sêmen resfriado em ovelhas com estro sincronizado. Quando as inseminações foram realizadas em ovelhas com estro natural e empregando-se 100 milhões de espermatozóides, as taxas foram de 78,6% para o sêmen fresco e 71,4% para o sêmen resfriado por 24 horas a 5°C.

Acredita-se que os resultados inferiores obtidos durante a época chuvosa, sejam devido às exposições destas ovelhas a fatores ambientais como a elevada umidade relativa do ar e variações de temperatura. MACHADO e SIMPLÍCIO (1998) já haviam observado este efeito negativo da época chuvosa, evidenciado pelas quedas nas taxas reprodutivas.

9 CONCLUSÕES

A apresentação da água de coco em forma de pó não altera as suas propriedades favoráveis ao metabolismo dos espermatozóides, mantendo uma boa sobrevivência das células espermáticas por um período equivalente a dois dias.

A adição de gema de ovo aos diluidores água de coco *in natura* e em pó (ACP-102), torna-se necessária para a manutenção da integridade e da qualidade do sêmen ovino resfriado a 4 °C, por um período de até dois dias.

A época do ano, nas condições climáticas do Estado do Ceará, tem influência sobre a qualidade do sêmen resfriado e avaliado *in vitro*, porém não inviabiliza sua utilização no decorrer do ano.

Ambos diluidores à base de água de coco apresentam boa capacidade conservadora, pois mantêm o sêmen ovino viável e com níveis satisfatórios de fertilidade, mesmo após 24 horas de resfriamento a 4 °C.

No Estado do Ceará, ao se trabalhar com um grande efetivo de ovelhas em épocas de chuvas intensas, deve-se recomendar que as inseminações artificiais sejam realizadas no fim da época seca com a devida suplementação alimentar; visto que os efeitos prejudiciais observados durante a época chuvosa, podem diminuir a eficiência reprodutiva das fêmeas inseminadas, acarretando em sérias perdas econômicas para o produtor.

10 PERSPECTIVAS

Novos ensaios utilizando-se a água de coco em forma de pó (ACP-102) deverão ser desenvolvidos, especialmente aqueles relacionados ao congelamento do sêmen ovino;

Desenvolvidos os experimentos sobre congelamento do sêmen ovino em diluidores à base de água de coco, a fertilidade de ovelhas inseminadas por via cervical poderia ser mensurada;

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUINSKI, P. I.A. intra-uterina acelera o melhoramento genético. **Revista A Granja**, Porto Alegre, n.541, ano 49, novembro de 1993.

AHMAD, M.; KHAN, A.; SHAH, Z.A.; AHNAD, K.M. Effects of removal of seminal plasma on the survival rate of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam , v.41, p. 193-199, 1996.

ALESSANDRO, A.G.D.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M.A.; BELLITTI, A. Post - thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. **Theriogenology**, New York, v. 55, p. 1159 - 1170, 2001.

ALLISON, A.J.; ROBINSON, T.J. Fertility of progestagen treated ewes in relation to the numbers and concentration of spermatozoa in the dose inseminate. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 24, p.1001-1008, 1971.

ANEL, L.; KAABI, M.; de la FUENTE, L.F.; de PAZ, P. Factors influencing the sucess of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, New York, v.63, p.1235-1247, 2005.

ARAÚJO, A.A. **Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle**. 2000. 81f. Tese (Doutorado em Ciências da Vida) – Université François Rabelais de Tours, Tours, 2000.

AURICH, J.E.; KÜNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma effects membrana integrity and motility of equine spermatozoa after criopreservation. **Theriogenology**, New York, v.46, p. 791-797, 1996.

AZIL, N.; FEAR, S.; TAYLOR, C.; KINGSLAND, C.R.; LEWIS-JONES, I. Human sperm head morphometric distribution and its influence on human fertility. **Fertility and Sterility**, Los Angeles, v.70, n.5, p.883-891, 1998.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J-C. **Manuel de formation pour l'insemination artificielle chez les ovins et les caprins**. INRA. Nouzilly, 231p., 1993.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames, Iowa, Iowa State University Press, 1989.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. New Jersey: Prentice-Hall, 4^a ed., 1997, 307p.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.65, p.75-88, 2001.

BRAZ, V.B. **Influência do diluidor, da temperatura de conservação e da taxa de diluição sobre a sobrevivência espermática in vitro do sêmen ovino resfriado**. 2003. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

BRAZ, V.B.; ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F.; MACHADO, V.P.; MOURA, A.A.A.; OLIVEIRA, K.P.L. Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 3, p. 328-329, 2003.

BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, New York, v.54, p. 129-136, 2000.

BUCKRELL, B.C.; BUSCHBECK, C.; GARTLEY, C.J.; KROETSCH, T.; MCCUTCHEON, W.; MARTIN, J.; PENSER, W.K.; WALTON, J.S. A breeding trial using a transcervical technique for artificial insemination in sheep. In: Proc. 12TH INT. CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION, v.3, p.1531-1533, 1992.

BUENDIA, P.; SOLER, C.; PAOLOCCHI, F.; GAGO, G.; URQUIETA, B.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyser computer-assisted system. **Theriogenology**, New York, v.57, p.1207-1218, 2002.

BYNE, G.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.62, p. 265 - 275, 2000.

CALVETE, J.J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H; KLUG, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. **Reproduction Domestic Animal**, Berlim, v.29, p.411-426, 1994.

CAMERON, R.D. Semen collection and evaluation in the ram. The effect of method of stimulation on response to eletroejaculation. **Australian Veterinary Journal**, Artarmon, v.53, n.8, p.380-383, 1977.

CAMPOS, A.C.N. **A água de coco criopreservada, proveniente de frutos de diferentes variedades e idades de maturação como diluidor do sêmen caprino**. 1999. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 1999.

CAMPOS, A.C.N. **Morfometria do trato genital masculino: influência do plasma seminal obtido em época seca ou chuvosa sobre espermatozóides caprinos**. 2003. 85f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2003.

CAMPOS, A.C.N.; FERREIRA, M.A.L.; FERREIRA, R.C.S.; FIGUEIRÊDO, E.L.; PINHEIRO, J.H.T.; MONTEIRO, A.W.U.; ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F. Termorresistência do sêmen caprino em diferentes diluidores. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 11, supl.2, p.105-108, 2001.

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W.U.; FIGUEIRÊDO, E.L.; PINHEIRO, J.H.T.; FERREIRA, M.A.L.; ARAÚJO, A.A. Viabilidade do sêmen caprino lavado e não lavado diluído em água de coco, resfriado e armazenado a 4 °C. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v.11, n.3, p. 178-182, set./dez., 2004.

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

CARNEIRO, G.F. Transporte e criopreservação de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, supl., n.5, p. 37-41, 2002.

CHEMINEAU, P.; COGNIÉ, Y. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. FAO Animal Production and Health Papr 83, Roma, 1991.

COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperm chez le bélier Ile-de-France I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition Development**, Jouy-en-Josas, v.20, n.6, p.1789-1799, 1980.

COLAS, G. Semen technology in the ram. In: THE MALE IN FARM ANIMAL REPRODUCTION, COLLOQUE CEE, 1983, Nouzilly. Proceedings: Coroutim, p.219-236, 1984.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame e avaliação de sêmen animal**. 2ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49p.

CORREA, J.R; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, New York, v.48, p.721-731, 1997.

CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal: Effect du glucose. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, Paris, v.14, n.4B, p.741-745, 1974.

CORTEEL, J.M. Production du sperm chez le bouc: variation saisonniere de la quantité et de la qualité du sperm recolte selon l'âge des animaux. **Journée Recherche Ovine et Caprine**, Paris, v.1, p.4-17, 1975.

CORTEEL, J.M. Effets du plasma seminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés *in vitro*. **Reproduction Nutrition Development**, Jouy-en-Josas, v.20, n.4, p.1111-1123, 1980.

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

CORTEEL, J.M. Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation. In: PROC. 5TH INT. CONF. ON GOATS. vol. II, New Delhi, India, 1992, p. 290-297.

CRUZ, J.F. **Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido a temperatura de + 4 graus por um período de 48 horas diluído em frações ativas da água de coco**. 1994. 40 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 1994.

DEEN DAAS, N. Laboratory assessment of semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 28, p. 87-94, 1992.

DIAS, R. P. **Efeito da sincronização do estro e do momento da inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia com sêmen congelado na fertilidade em ovelhas no Nordeste do Brasil**. Fortaleza, 1993. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 1993.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; KUMMEN, E.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.84, p.359-368, 2004.

EVANS, G. Current tropics in artificial insemination of sheep. **Journal Biology Science**, v.41, p.103 -116, 1988.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990, 194p.

FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. EDUSP. São Paulo, cap. 4,1979.

FERNANDÉZ-ABELLA; PREVE, M.O., VILLEGAS, N. Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. **Theriogenology**, New York, v.60, p.21-26, 2003.

FIGUEIRÊDO, E. L. **Viabilidade *in vitro* e *in vivo* do sêmen caprino diluído em água de coco e resfriado a 4°C**. 2002. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, CE.

FIGUEIRÊDO, E. L.; MONTEIRO, A.W.U.; SILVA FILHO, A.H.S.; CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F. Avaliação *in vitro* do sêmen ovino resfriado diluído em água de coco previamente criopreservada em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.25, n.2, p. 428-429, 2001.

FISER, P.S; AINSWORTH L.; LANGFORD G.A. Effect of osmolarity of skim-milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. **Cryobiology**, York, v.18, p. 399 - 403, 1981.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. **Cryobiology**, York, v.23, n.6, p.518-529, 1986.

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

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

FREITAS, V.J.F. **Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina coriônica (hCG) inseminadas artificialmente**. 1988. Trabalho de conclusão de curso (Especialização) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza. 1988.

FREITAS, V.J.F. **Parâmetros andrológicos e avaliação *in vitro* do sêmen de ovinos deslanados criados na região litorânea do Nordeste brasileiro em estação seca e chuvosa**. 1992. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza. 1992.

FREITAS, V.J.F.; NUNES, J.F. Parâmetros andrológicos e seminais de carneiros deslanados criados na região litorânea do Nordeste Brasileiro em estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 16, n. 3-4, p. 95-104, 1992.

GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2001, 340p.

GUÉRIN, Y. Méthodes de conservation de la semence ovine. El & Ins. Nouzilly. V23336, p.102-103, 1990. Resume.

HAFEZ, E.S.E. Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryos. In: **Reproduction in farm animals**, Filadelfia, 6. ed. Lea & Febiger, p. 515-25, 1993.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995, 582p.

HALBERT, G.W.; DOBSON, H.; WALTON, J.S.; BUCKRELL, B.C. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, New York, v.33, p. 993 - 1010, 1990.

HAMMERSTEDT, R.; GRAHAM, J.; NOLAN, J. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, Madison, v. 11, p. 73-88, 1990.

HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.S.; KAVANAUGH, J.F.; ORIEL, JR, L.C. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Madison, v.52, p.390-397, 1995.

JONES, R.C. Studies of the suitability of preparations of ewe and cow milk for storing ram spermatozoa at 37,5 and -79°C. **Journal of Biology Science**, Austrália, v. 22, p. 983 - 984, 1969.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum and testis to scrotum and teste and testicular thermoregulation in bulls and rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.108, p.81 - 85, 1996.

KAYA, A.; AKSON, M.; TEKELI, T. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic of seminal plasma in ram. **Small Ruminant Research**, Lennoxville, v.44, p.153-158, 2002.

LAGUNA, L.E. **Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades (Cocus nucifera L.) coco da praia e anão**. 1996. Trabalho de conclusão de curso (Especialização) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza. 1996.

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

LETHAN, D.S. **Physiology Plant**, v.32, p.66, 1974.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em ovelhas deslanadas. Sobral: EMBRAPA – CNPC, 1990.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 19, p. 61-72, 1995.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. Efeito da raça do padreador e da época de monta sobre a eficiência reprodutiva de ovelhas deslanadas acasaladas com reprodutores de raças especializadas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.27, n.1, p.54-59, 1998.

MACHADO, V.P. **Inseminação artificial cervical ou laparoscópica em ovelhas com diluidores à base de água de coco** 2003. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2003.

MACHADO, V.P.; FERNÁNDEZ, D.R.P; CORDEIRO, M.A.; ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F. Inseminação artificial em ovelhas Santa Inês com sêmen resfriado (4°C) e diluído em solução à base de água de coco. In: 8º ENCONTRO DE PESQUISADORES DA 7ª SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UECE, 2002.

MAIA, M.S. Avaliação andrológica em carneiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, supl., n. 5, p. 33-34, 2002.

MAMPOUYA, C. **Etude de la survie et de la fécondance du sperm de bélier après conservation à l'état liquide congelé**. 1973. Thèse Docteur de Troisième Cycle. U.E.R. Sciences Exacter et Naturelles – Université de Clermont – Ferrand, France, 1973.

MANDIKI, S.N.M.; DERYCKE, G.; BISTER, J.L.; PAQUAY, R. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams. I. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. **Small Ruminant Research**, Lennoxville, v.28, p.67 - 79, 1998.

MARQUES, A.L.V. Água de coco. **Informativo socego**. A. 2, 92. 1982.

MARTINS, R.D.; McMANUS, C. CARVALHÊDO, A.S.; BORGES, H.V.; SILVA, A.E.D.F.; SANTOS, N.R. Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, Supl. 1, v.32, n.6, p.1594-1603, 2003.

MATHEW, J.; RAJA, C.K.S.U.; NAIR, K.P. Preservation of buck semen in TRIS yolk diluent. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS. **Proceedings...** Tuckson Dairy Goats J. Pub. Co., 1982 p. 506.

MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid Storage of Ram Semen: a Review. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v.5, p.613-638, 1993.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, p.55-65, 1996.

MEGHAN, C.; WUSTER-RADELIFF E.; LEWIS, G. Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of new transcervical artificial catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. **Theriogenology**, New York, v.58, p.1361-1371, 2002.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais**. Porto Alegre: Sulina. 1987.

MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes, **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.5, p.29-33, 2000a.

MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P. Inseminação intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.5, p.35-39, 2000b.

MORAES, J.C.F. Avaliação reprodutiva do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.21, n.1, p.10-9, 1997.

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

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

NUNES, J.F. **Études préliminaires de la recherche sur le rôle physiologique du plasma séminal de bouc**. Paris. Université Pierre et Marrie Curie, (DEA). 1980.

NUNES, J.F. **Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des espermatozoïdes de bouc**. 1982. Thèse de doctorat, 3e cycle, Paris VI. 1982.

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

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

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

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

NUNES, J.F. Fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.12, p.77-83, 1988b.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; PRYSCILA, L. Utilisation d'une substance active "JYP" present dans l'eau de coco pour la conservation 'in vitro'et la fertilité des spermatozöides des mammifers. S.l.: Sn. 1994.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS. Fortaleza: [sn], 1995.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e de suas frações ativas como diluidor de sêmen de mamíferos domésticos. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.2, p.15-21, 1995.

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

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

NUNES, J.F.; FERNÁNDEZ, D.R.P. **Biotécnicas de la reproducción caprina y ovina**. Fortaleza: 2M. 2001, 105p.

OLLERO, M.; GARCÍA-LOPÉZ, N.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phases system. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v.9, p.381-390, 1997.

PAGANINI FILHO, P.; BICUDO, S.D.; SOUZA, M.I.L.; SOUSA, D.B. Viabilidade do sêmen ovino frente a três diluidores em temperaturas de 37 °C e sob refrigeração. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.21, n.2, p.61-64, 1997.

PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; PÉREZ-PÉ, R.; BERG, K.A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, New York, v. 57, p. 823-36, 2002.

PÉREZ, B.; MATEOS-REX, E. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malgueña breeds. **Small Ruminant Research**, Lennoxville v.22, p.163 -168,1996.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v.164, p.666, 1949.

PREVOT, P. L'utilisation du lait de coco comme accélérateur de croissance des végétaux. *Oleagineux* 23, v. 3, p. 177-178, 1968.

REGE, J.E.O.; TOE, F.; MUKASA-MURGEWA, E.; TEMBELY, S.; ANINDO, D.; BAKER, R.L.; LAHLOU-KASSI, A. Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep. II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. **Small Ruminant Research**, Lennoxville, v.37, p.173-187, 2000.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VÁSQUEZ, J.M.; COY, P. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciana-Granadina goats in the Mediterranean. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.29, p.255-263, 1992.

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**, Lennoxville, v. 25, p. 147-153, 1997.

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

RODRIGUES, A.P.R., TORRES, M.Z.G., OLIVEIRA, L.F.; NUNES, J. F. Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como diluidores do sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, Olinda. **Anais...**Olinda, p.540. 1994.

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

SAHNI, K.L. Practical aspect of artificial insemination of goats in India. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT, 4, **Proceedings...** Brasília: EMBRAPA – DCT. 1987, p. 549-569.

SALAMON, S. Artificial Insemination of Sheep. **Publicity Press**, 104p,1976.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.37, p.185-249, 1995.

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

SALAMON, S.; ROBINSON, T.J. Studies on the artificial insemination of Merino sheep. II The effects of semen diluents and storage on lambing performance. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 13, n.2 p.270-281, 1962.

SALAMON, S.; VISSER, D. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by pellet method. **Journal Biological Science**, v.25, p.605-618, 1972.

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

SAMPAIO NETO, J.C.; SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J.F. Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, supl., n.5, p. 137-139, 2002.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P., MAXWELL, W.M.C. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v.9, p.689-696, 1997.

SANCHEZ - PARTIDA, L.G.; WINDSOR, D.P.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine with frozen - thawed ram semen. **Journal of Andrology**, Madison, v.2, p. 280 – 283, 1999.

SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. **Guia Prático do Inseminador de Caprinos e Ovinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, 32p., 1999. (Embrapa Caprinos Documentos, 34).

SELAIVE-VILLARROEL, A.B.; MIES FILHO, A.; JOBIM, M.I.M. Estudo sobre produção de sêmen em carneiros. 1. Efeito da época do ano. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.9, n.4, p.166 -169, 1985.

SILVA, A.E.D.F; NUNES, J.F. Estacionalidade na atividade sexual e qualidade do sêmen nos ovinos deslanados das raças Santa Inês e Somalis. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.8, p.207-214, 1984.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; BARROSO, E.M.; SILVA, L.D.M. Avaliação do sêmen canino congelado diluído em água de coco ou TRIS. In: IV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UECE. Fortaleza, p. 265, 1998.

SILVA, A.R; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Criopreservação do sêmen canino diluído em tris-gema com diferentes concentrações de glicerol. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 10, supl., 1, p. 148-149, 2000.

SINGH, M.P.; SINHA, S.N.; SINGH, B. Studies on preservation of buck semen. **Indian Veterinary Medicine Journal**, v.6, p.123-130, 1982.

SKANDHAN, K.P. Zinc in normal human seminal plasma. **Andrologia**, Giessen, v.13, n.4, p.436-451, 1981.

SOUSA, D.B. **Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial**, 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002.

SOUZA, A.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M.; MERGULHÃO, F.C.C.; NEVES, A.C.; WISCHRAI, A. Congelação de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, supl., n.5, p.103-105, 2002.

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

TONIOLLI, R. Estudo das características *in vitro* do sêmen caprino de raças nativas do Nordeste brasileiro diluído em água de coco sob a forma *in natura*, estabilizada e de gel. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.13, p. 209-220, 1989a.

TONIOLLI, R. Conservação do sêmen suíno em água de coco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8, Belo Horizonte, **Anais...**Belo Horizonte. p. 138-142. 1989b.

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

TONIOLLI, R.; BATITEAU, F.; BUSSIÉRE, J.; COUROT, M.; COMBARNOUS, Y. Conservation prolongée du sperm frais de verrat: diluer – JYP – fertilité et prolificité de truies. **Journées Rech. Porcine**, France, v. 27, p. 67 – 70, 1995.

TULI, R.K.; HOLTS, W. Effects of season on the freezability of boer goat semen on the northern temperature zone. **Theriogenology**, New York, v.43, p.1359-1363, 1995.

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

VIEIRA DE SÁ, F. O leite: Noções Gerais. In: **As Vacas Leiteiras**. 7.ed. Colégio Técnico Agrícola , Lisboa, 1990.

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. **Australian Journal of Biological Sciences**, Collingwood, v.28, p. 145-152, 1975.

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. **Theriogenology**, New York, v.6, p.559-564, 1976.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E. & NEIL, J. (eds.). **The Physiology of Reproduction**, Raven, New York, 1994.

ANEXOS

Artigo aceito para publicação no periódico “**Revista Brasileira de Ciência
Veterinária**”

v. 13, 2007

**Inseminação artificial de ovelhas Santa Inês com sêmen diluído em água
de coco *in natura* e em pó no Estado do Ceará**

(Artificial insemination of Santa Inês ewes with diluted semen in coconut water
in natura and in powder in the Ceará state)

Emmanuelle Lima de Figueirêdo, José Ferreira Nunes, Marina Albuquerque
Cordeiro, Priscila Teixeira de Souza, Renato Nogueira Diógenes Filho, Virgílio
Emanuel Vieira, Artur Henrique Soares da Silva Filho, Fernando Lucas Torres
de Mesquita, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, José Valmir Feitosa

**Inseminação artificial de ovelhas Santa Inês com sêmen diluído em água
de coco *in natura* e em pó no Estado do Ceará**

Artificial insemination of Santa Inês ewes with diluted semen in coconut water *in natura* and in powder in the Ceará State

Emmanuelle Lima de Figueirêdo, * José Ferreira Nunes, * Marina Albuquerque
Cordeiro, * Priscila Teixeira de Souza, * Renato Nogueira Diógenes Filho, *
Virgílio Emanuel Vieira, * Artur Henrique Soares da Silva Filho, * Fernando
Lucas Torres de Mesquita, * Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, * José
Valmir Feitosa**

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fertilidade de ovelhas após inseminação com sêmen diluído em água de coco *in natura* (ACIN) e em pó (ACP-102) e resfriado a 4 °C por 24 horas, durante o período chuvoso e seco no Estado do Ceará. As ovelhas foram previamente submetidas a tratamento hormonal, através da colocação de esponjas intravaginais impregnadas com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona, onde permaneceram durante 14 dias. No dia da retirada das esponjas foram administradas por via intramuscular 200 UI de gonadotrofina coriônica equina. As ovelhas foram distribuídas em dois lotes experimentais de acordo com o tipo de diluidor de sêmen utilizado para a inseminação artificial: lote A (ACIN) e lote B (ACP-102). As inseminações foram realizadas entre 50 e 55 horas após a retirada das esponjas com sêmen

* Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará, UECE, Av Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE. lukafig@yahoo.com, ferreiranunes@hotmail.com, marinaa.cordeiro@bol.com.br, pritex17@gmail.com, renatinnn@bol.com.br, vevieira@yahoo.com, tufilho@bol.com.br, fltm@ig.com.br, crismello76@hotmail.com.

** Departamento de Zootecnia - Universidade Federal do Ceará, UFC, Campus do Pici, Av. Mister Hull, s/n, Pici, CEP:60.455-760. valmir_feitosa@yahoo.com.br

resfriado por 24 horas. Não foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os diluidores testados. Com relação à época da inseminação, verificou-se uma maior taxa de prenhez (83,30%) durante a época seca do que na chuvosa (68,69%). Conclui-se que ambos diluidores à base de água de coco apresentam boa capacidade conservadora, pois mantêm o sêmen ovino viável e com níveis satisfatórios de fertilidade mesmo após 24 horas de resfriamento a 4°C. Independente do diluidor utilizado, a época da inseminação artificial no estado do Ceará pode influenciar a taxa de prenhez em ovelhas.

Palavras-chave: sêmen, ovelhas, diluidor, resfriamento.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the fertility of ewes after artificial insemination with semen diluted in coconut water *in natura* (CWIN) and in powder (ACP-102) and cooled at 4°C for 24 hours, during the rainy and dry period in the Ceará State. The ewes were previously submitted to a hormonal treatment, through of the placing of intra-vaginal sponges impregnated with 50 mg of medroxyprogesterone acetate, where it was remain during 14 days. In the day of the removal of the sponges were injected intramuscularly, 200 IU of equine chorionic gonadotrophin. The ewes were distributed in two experimental groups agreed with the extender of semen used to artificial insemination: group A (CWIN) and group B (ACP-102). The inseminations with cooled semen for 24 hours were achieved between 50 and 55 hours after the removal of the sponges. No statistical difference ($P < 0.05$) has been found between extenders tested. Regarding season of the insemination was observed higher pregnancy rate (83.30%) during the dry season in comparison with the rainy season (68.69%). In conclusion, both extenders

based on coconut water present good preservative capacity, since the ram semen is maintained viable and with satisfactory values of fertility after 24 hours of cooling to 4 °C. Independently of extender used, the season of the artificial insemination in the Ceará State can influence the pregnancy rate in ewes.

Keywords: semen, ewes, extender, cooling.

Introdução

A inseminação artificial é uma técnica que permite a aceleração dos benefícios advindos do melhoramento animal, já que o patrimônio genético dos melhores reprodutores pode ser utilizado de forma mais eficiente, se difundido para um maior número de fêmeas (Aguinski, 1993).

O emprego de sêmen resfriado vem se tornando cada vez mais popular, aumentando significativamente seu uso durante a última década, em decorrência da praticidade e viabilidade espermática desta biotécnica (Carneiro, 2002). Muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de melhorar a capacidade fertilizante do sêmen ovino congelado e resfriado que ainda apresentam resultados insatisfatórios quando utilizado *in vivo* (Milczewski et al., 2000).

Segundo Roca et al. (2000), o uso efetivo de sêmen resfriado para inseminação artificial, depende da habilidade do diluidor em promover um ambiente apropriado para o espermatozóide durante sua conservação. Independente do diluidor utilizado para o sêmen resfriado, o tempo de utilização é limitado a aproximadamente 10 horas, e após 24 horas de armazenamento, a fertilidade diminui significativamente com o emprego da inseminação cervical (Maxwell e Salamon, 1993). Como agravante, na região semi-árida do Nordeste do Brasil, são determinadas duas épocas, seca e

chuvosa, que interferem na disponibilidade de alimentos, na temperatura e influenciam conseqüentemente a atividade sexual do macho caprino e ovino (Silva e Nunes, 1984).

A viabilidade e um maior tempo de sobrevivência dos espermatozóides da espécie ovina requerem prioridade na busca de diluidores que permitam uma maior proteção das células espermáticas. Neste contexto, encontra-se a água de coco que tem demonstrado exercer ação benéfica sobre os espermatozóides de vários mamíferos domésticos. Com o intuito de simplificar a utilização da água de coco como diluidor, Salgueiro et al. (2002) a padronizaram na forma de pó, constituindo o produto ACP-102.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a fertilidade de ovelhas após inseminação com sêmen diluído em água de coco *in natura* (ACIN) e em pó (ACP-102) e resfriado a 4°C por 24 horas, durante a época chuvosa e seca no Estado do Ceará.

Material e métodos

O experimento foi conduzido em propriedade particular situada no município de Boa Viagem-CE, localizado na microrregião do sertão de Quixeramobim, possuindo as coordenadas geográficas: 05°13'18,6" de latitude sul e 39°48'19,4" de longitude oeste.

Foram utilizadas 94 ovelhas mestiças de Santa Inês na época chuvosa e 120 na época seca, com idade média de três anos e submetidas a manejo semi-intensivo. Estas fêmeas foram previamente submetidas a tratamento hormonal, através da colocação de esponjas intravaginais impregnadas com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), que permaneceram durante 14 dias na porção cranial da vagina. No dia da retirada das esponjas foram

administradas por via intra-muscular 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG).

As ovelhas foram distribuídas em dois lotes experimentais compostos por 50% de ovelhas cada, de acordo com o tipo de diluidor de sêmen utilizado para a inseminação artificial: lote A (ACIN) e lote B (ACP-102). Durante a época seca, foram perdidas seis fêmeas do experimento, resultando num total de 114 ovelhas (60 foram inseminadas com ACIN e 54 com ACP-102).

Em cada época estudada, o sêmen de dois carneiros da raça Santa Inês, previamente selecionados para as inseminações, foi colhido e submetido à avaliação do volume (mL), motilidade massal (escore 0 a 5) e concentração espermática ($\times 10^9$ spz/mL). Em seguida foram divididos em duas alíquotas, diluídos em água de coco *in natura* (50 mL de ACIN + 50 mL de citrato de sódio a 2,5%) e em pó (ACP-102 + 100 mL de água destilada) e finalmente resfriados a 4 °C por 24 horas.

O sêmen previamente resfriado foi transportado ao local da inseminação em recipiente térmico, sendo envasado em palhetas de 0,50 mL, contendo uma concentração de 200 milhões de espermatozóides por dose, somente no momento das inseminações (50 e 55 horas após a retirada das esponjas). Todas as ovelhas foram inseminadas por via cervical independente do aparecimento do estro.

Para o diagnóstico de gestação, foi utilizado um aparelho de ultrassom Pie Medical LC Vet 100 com transdutor linear de 6-8 MHZ por via transretal, cerca de 50 dias após as inseminações. A fertilidade foi avaliada através da comparação da taxa de prenhez entre os dois períodos (chuvoso e seco) e os dois diluidores.

A taxa de fertilidade foi comparada entre os dois tratamentos (ACIN e ACP-102) e as duas épocas (chuvosa e seca) e analisadas através do teste do Qui-quadrado, estimando-se a média e desvio padrão com nível de significância de 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Nenhum dos diluidores (ACIN e ACP-102) mostrou efeito significativo sobre os resultados. O nível de significância para o efeito da época, está expresso na Tab. 1. Foi observada diferença significativa somente entre as épocas chuvosa e seca ($p = 0,003$).

As taxas de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen diluído em ACIN ou ACP-102 e resfriado a 4°C por 24 horas durante as épocas chuvosa e seca são apresentados na Tab. 2. Durante a época chuvosa a maior taxa de prenhez foi observada nas ovelhas inseminadas com o diluidor ACP-102, enquanto que na época seca com a utilização do diluidor ACIN verificou-se maior taxa de ovelhas gestantes. Porém, a diferença não foi estatisticamente significativa.

Segundo Maxwell e Salamon (1993), os vários diluidores utilizados para conservação do sêmen ovino resfriado a 4 ou 15°C não permitem um armazenamento longo, sendo a sua utilização limitada a 8 horas para obtenção de boas taxas de fertilidade. Após 12 – 24 horas de armazenamento, o poder fecundante do sêmen diminui (30% ou mais), e conseqüentemente, a fertilidade após a inseminação artificial.

No presente estudo, os resultados de prenhez para os dois diluidores testados, independente da época, foram bastante satisfatórios, uma vez que as

inseminações foram realizadas por via cervical e com sêmen resfriado por 24 horas. Estes valores foram semelhantes aos obtidos por via intra-uterina com sêmen ovino resfriado a 5°C por 8 a 10 horas, em estudo realizado por Milczewski et al. (2000).

A sincronização do estro implica no tratamento hormonal em ovelhas e isto pode ter um efeito negativo sobre a fertilidade (Anel et al., 2005), porém no presente estudo, as ovelhas que foram sincronizadas hormonalmente, obtiveram taxas de prenhez variando entre 61,70% e 85%. Estes resultados foram próximos aos verificados por Donovan et al. (2004), que não observaram diferença significativa em taxas de prenhez entre ovelhas inseminadas com sêmen fresco durante o estro natural (82%) e àquelas submetidas à sincronização (70%).

No trabalho atual, a dose inseminante foi de 200 milhões de espermatozóides, semelhante à utilizada por Sousa (2002), que obteve médias de prenhez de 41, 9% com sêmen fresco e 21,5% com sêmen resfriado em ovelhas com estro sincronizado. Quando as inseminações foram realizadas em ovelhas com estro natural e empregando-se 100 milhões de espermatozóides, as taxas foram de 78,6% para o sêmen fresco e 71, 4% para o sêmen resfriado por 24 horas a 5°C.

As taxas de prenhez de ovelhas inseminadas durante as épocas chuvosa e seca estão expressas na Fig. 1. Foi observada maior taxa de prenhez durante a época seca (81,58%) quando comparada com a época chuvosa (63,83%). Acredita-se que estes menores resultados obtidos durante a época chuvosa, sejam devido às maiores exposições destas ovelhas às parasitoses e doenças pulmonares, além da qualidade das pastagens que

pode ter sido afetada pelo excesso de chuva que ocorreu durante o experimento. Machado e Simplício (1998), já haviam observado este efeito negativo da época chuvosa sobre o nascimento de cordeiros, evidenciado pelas quedas nas taxas reprodutivas devido à mortalidade das crias por pneumonias e por proliferação de eventuais patógenos no ambiente com maior umidade.

Tabela 1 - Taxas de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen diluído em ACIN e ACP-102 e resfriado a 4°C por 24 horas durante a época chuvosa (n = 94) e seca (n = 114).

	Época chuvosa		Época seca	
	Nº	Porcentagem	Nº	Porcentagem
ACIN	29 (47)	61,70%	51 (60)	85,00%
ACP-102	31 (47)	65,96%	42 (54)	77,78%
Total	60 (94)	63,82%**	93 (114)	81,58%*

*, ** Épocas chuvosa e seca diferiram ($\chi^2 = 8,34$; $p = 0,003$).

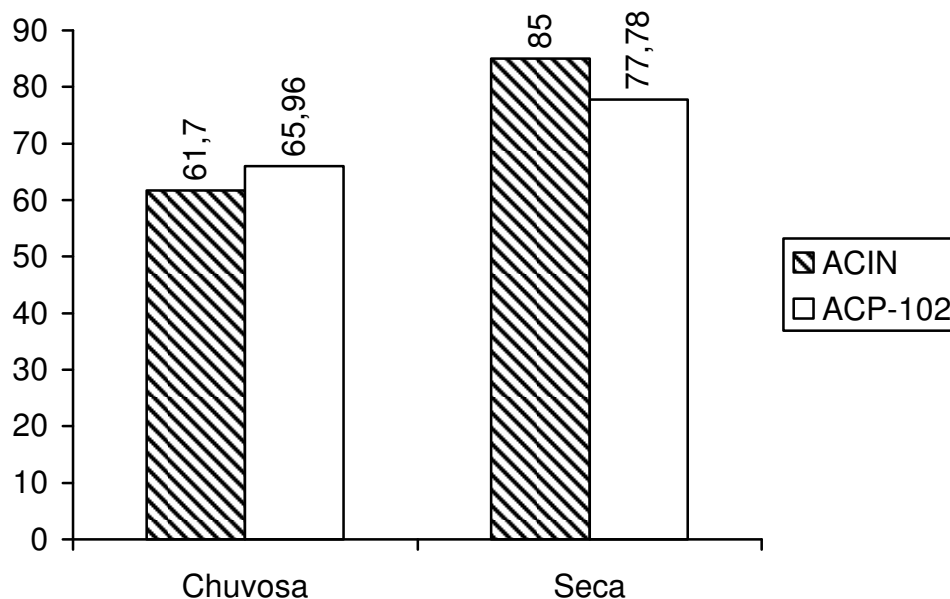


FIGURA 1 – Taxas de prenhez em ovelhas inseminadas durante a época chuvosa e seca no Estado do Ceará com sêmen diluído em água de coco *in natura* (ACIN) e em pó (ACP-102).

Conclusões

Conclui-se que ambos diluidores à base de água de coco apresentam boa capacidade conservadora, pois mantêm o sêmen ovino viável e com níveis satisfatórios de fertilidade mesmo após 24 horas de resfriamento a 4 °C.

Independente do diluidor utilizado (ACIN ou ACP-102), a época da inseminação artificial no estado do Ceará pode influenciar a taxa de prenhez em ovelhas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

Referências

- AGUINSKI, P. I.A. intra-uterina acelera o melhoramento genético. *Rev. A Granja*, Porto Alegre, n.541, ano 49, novembro de 1993.
- ANEL, L.; KAABI, M.; de la FUENTE, L.F.; de PAZ, P. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*, New York, v.63, p.1235-1247, 2005.
- CARNEIRO, G.F. Transporte e criopreservação de sêmen eqüino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, Supl., n.5, p. 37-41, 2002.
- DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; KUMMEN, E.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v.84, p.359-368, 2004.
- MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. Efeito da raça do padreador e da época de monta sobre a eficiência reprodutiva de ovelhas deslanadas acasaladas com reprodutores de raças especializadas de corte. *Rev. Bras. Zoot.*, Viçosa, v.27, n.1, p.54-59, 1998.
- MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reprod. Fertil. Dev.*, Collingwood, v. 5, p.613-638, 1993.
- MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes, *Arch. Vet. Sci.*, Curitiba, v.5, p.29-33, 2000.
- MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P. Inseminação intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. *Arch. Vet. Sci.*, Curitiba, v.5, p.35-39, 2000.
- ROCA, J.; MARTÍNEZ, S.; VASQUEZ, J.M.; LUCAS, X. PARRILLA, I.; MARTINEZ, E.A. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-

buffer extenders and stored at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v. 64, p. 103-112, 2000.

SALGUEIRO, C.C. de M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.E.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, Supl., n. 5, p. 96-98, 2002.

SILVA, A.E.D.F.; NUNES, J.F. Estacionalidade na atividade sexual e qualidade do sêmen nos ovinos deslanados das raças Santa Inês e Somalis. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.8, p.207-214, 1984.

SOUSA, D.B. *Viabilidade do sistema Equitainer[®] na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial*, 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2002.

Artigo submetido ao periódico “**Ciência Animal Brasileira**”

**Utilização de diluidores à base de água de coco para resfriamento do
sêmen ovino a 4 °C por até 48 horas no Estado do Ceará**

(Use of extenders based on coconut water for cooling ram semen at 4 °C for up
to 48 hours in the Ceará state)

Emmanuelle Lima de Figueirêdo, José Ferreira Nunes, Airton Alencar de
Araújo, Marina Albuquerque Cordeiro, Priscila Teixeira de Souza, Renato
Nogueira Diógenes Filho, Ana Cláudia Nascimento Campos e José Valmir
Feitosa

**Utilização de diluidores à base de água de coco para resfriamento do sêmen ovino
a 4°C por até 48 horas no Estado do Ceará**

(Use of extenders based on coconut water for cooling ram semen at 4 °C for up to 48
hours in the Ceará State)

Emmanuelle Lima de Figueirêdo¹, José Ferreira Nunes¹, Airton Alencar de Araújo¹,
Marina Albuquerque Cordeiro¹, Priscila Teixeira de Souza¹, Renato Nogueira Diógenes
Filho¹, Ana Cláudia Nascimento Campos² e José Valmir Feitosa²

1. Faculdade de Veterinária, UECE, CEP: 60.740-000, Fortaleza-CE, Brasil

2. Departamento de Zootecnia, UFC, Fortaleza-CE

E-mail: lukafig@yahoo.com;

RESUMO

Diluidores à base de água de coco em pó (ACP-102) ou *in natura* (ACIN) foram utilizados para resfriamento do sêmen ovino colhido durante as épocas chuvosa (fevereiro a abril) e seca (outubro a dezembro). Testes de termorresistência foram realizados aos 5, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C, para avaliação do vigor (VIG) e da motilidade (MOT), após 2, 24 e 48h de resfriamento a 4°C. Com relação ao VIG e MOT, houve diferença estatística entre os diluidores ($P<0,05$), dentro de cada tempo de resfriamento e época do ano. Diferenças significativas foram observadas entre as épocas chuvosa e seca ($P<0,05$), quanto ao VIG, com resultados superiores no período chuvoso. Conclui-se que a água de coco em pó (ACP-102) poderá tornar-se uma alternativa para diluição e resfriamento do sêmen ovino a 4°C, pois manteve a sobrevivência espermática por até 48h, comparável à água de coco *in natura*. Verificou-

se que a época seca do ano, nas condições do Estado do Ceará, influi negativamente sobre o vigor espermático, porém não inviabiliza sua utilização.

PALAVRAS-CHAVE: diluidor, resfriamento, sêmen, ovino.

SUMMARY

Extenders based on coconut water in powder (ACP-102) or *in natura* (CWIN) were used for cooling ram semen collected during rainy (February to April) and dry (October to December) seasons. The thermoresistance tests were performed at 5, 60 and 120 minutes of incubation to evaluation of vigor (VIG) and progressive motility (MOT), after 2, 24 and 48h of cooling at 4°C. Regarding VIG and MOT, there were observed statistical differences between extenders ($P<0.05$), within each cooling period and season of the year. Significant differences were observed between raining and dry periods ($P<0.05$), regarding to VIG, with superior results at rainy season. In conclusion, the ACP-102 might becomes an alternative for dilution and cooling ram semen at 4°C, since it maintained the spermatic survival for up to 48h, comparable to coconut water *in natura*. In the conditions of Ceará State, the dry season influences negatively on the spermatic vigor, however without compromise its use.

KEYWORDS: extender, cooling, semen, ram.

INTRODUÇÃO

Na região semi-árida do Nordeste do Brasil, os efeitos do clima delimitam duas épocas, uma seca e outra chuvosa. Esse aspecto interfere na disponibilidade e qualidade das forragens e na temperatura ambiente e dessa forma influencia a atividade sexual dos machos caprinos e ovinos deslanados (SILVA & NUNES, 1984). Como agravante, o processo de conservação do sêmen ovino provoca danos aos espermatozóides, reduzindo a sua capacidade fecundante (SALAMON & ROBINSON,

1962; MAXWELL & WATSON, 1996). Os efeitos prejudiciais da conservação são menos pronunciados no sêmen resfriado do que no sêmen congelado (MAXWELL & WATSON, 1996). Assim, o uso do sêmen resfriado poderia ser uma alternativa ao sêmen congelado, desde que utilizado num curto espaço de tempo após a coleta (PAULENZ et al., 2002).

Os vários diluidores utilizados para conservação do sêmen ovino resfriado a 4°C ou 15°C não permitem o armazenamento por um período longo. Para o sêmen conservado a 15°C ou 4°C, os períodos máximos de conservação para a obtenção de taxas aceitáveis de fertilidade após inseminação cervical é de 6 a 12 horas e de 24 horas, respectivamente (EVANS & MAXWELL, 1990).

Uma solução à base de água de coco com comprovado poder protetor para as células espermáticas, tem sido apontada como uma alternativa tecnológica de meio diluidor para sêmen (FLORES & NUNES, 1992). No entanto, sua utilização depara-se com algumas dificuldades de ordem prática, como a disponibilidade de frutos com seis meses de maturação e a impossibilidade de armazenamento (BRAZ et al., 2003).

Com o intuito de simplificar a utilização da água de coco como diluidor, SALGUEIRO et al. (2002) a padronizaram na forma de pó, constituindo o produto ACP-102, para uso na espécie ovina. Este trabalho teve como objetivo utilizar a água de coco *in natura* e em pó para o resfriamento do sêmen ovino a 4°C por até 48 horas, durante as épocas chuvosa e seca no Estado do Ceará.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO) da Universidade Estadual do Ceará, em Fortaleza - CE que está

situada em uma planície litorânea a 3°45'47" de latitude sul e 38°30'37" de longitude oeste.

Foram utilizados quatro machos ovinos da raça Santa Inês com idade média de um ano, submetidos ao regime de manejo intensivo de criação. Os animais foram mantidos em baias de alvenaria individuais, recebendo no cocho, 500g de concentrado, capim-elefante picado, feno de tifton, sal mineral e água à vontade. O sêmen dos reprodutores foi coletado por meio de vagina artificial, uma vez por semana nas épocas chuvosa (fevereiro a abril) e seca (outubro a dezembro), perfazendo um total de 48 ejaculados por período.

Foram testados dois diluidores elaborados conforme protocolo a seguir: ACIN- 50 mL de água de coco *in natura* filtrada + 50 mL de solução de citrato de sódio a 2,5% e ACP-102 – água de coco em pó tamponada (6g) + 100 mL de água destilada. Foram retirados 3,0% do volume total de cada diluidor e acrescentada a mesma quantidade de gema de ovo. A água de coco em pó foi obtida através de um processo de pulverização da água de coco *in natura* (endosperma líquido) em aparelho denominado “Spray Dryer”.

Após a colheita, o sêmen de cada reprodutor foi avaliado quanto ao volume (mL), motilidade massal (escore de 0-5) e concentração espermática ($\times 10^9$ spz/mL). O sêmen foi dividido em duas alíquotas, que foram diluídas em ACIN e ACP-102 (concentração final de 200×10^6 spz/mL), previamente aquecidos a 37°C em banho-maria. Em seguida, os tubos de ensaio contendo as amostras foram acondicionados em geladeira, dentro de beakers contendo água do banho-maria (a 37°C) até que a temperatura atingisse 4°C.

Amostras do sêmen resfriado foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR) em banho-maria a 37°C e avaliadas quanto ao vigor (VIG) e motilidade (MOT)

aos 5, 60 e 120 minutos de incubação. Estas avaliações foram realizadas às 2, 24 e 48h de resfriamento. A taxa de degradação da motilidade (TDM) foi calculada ao final de cada TTR e tempo de resfriamento, pela seguinte fórmula:

$$\text{TDM} = \frac{\text{VIG 5 min} - \text{VIG 120 min}}{\text{VIG 5 min}} \times 100$$

Os parâmetros de VIG, MOT e TDM, nos diferentes tempos de conservação (2, 24 e 48h) e diluidores (ACIN e ACP-102), foram expressos em média e desvio padrão e submetidos ao teste Tukey, utilizando-se um delineamento em parcelas subdivididas ($P < 0,05$). Os ejaculados foram considerados repetições para cada tempo de conservação e diluidor testado (The SAS System, 8.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de vigor (VIG) e motilidade (MOT) do sêmen ovino resfriado por até 48 horas, nos diluidores e épocas testadas durante o TTR, são mostrados nas Tabelas 1, 2 e 3. A TDM, calculada após o TTR, pode ser observada na Figura 1.

Verificou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre os diluidores ACIN e ACP-102, com relação aos valores de VIG. Já os valores da MOT não diferiram entre as amostras da época seca, resfriadas por 2 e 24 horas e incubadas por até 60 minutos. O presente estudo demonstrou que o diluidor ACP-102 apresenta capacidade conservadora, pois apresentou valores próximos aos observados no diluidor ACIN, apesar de estatisticamente inferiores. Num estudo recente, BRAZ (2003) comparou a utilização do diluidor ACP-102 com a do diluidor à base de leite no resfriamento do sêmen ovino por até 24 horas e observou que ambos apresentaram valores bem próximos com relação aos parâmetros de motilidade.

Verificou-se neste estudo, que o processo de resfriamento causou significativa redução na qualidade espermática, conforme havia sido observado por MILCZEWSKI et al. (2000). Segundo SALAMON & MAXWELL (1995), a diminuição e aumento na temperatura, assim como a manipulação do sêmen durante o processo de conservação, promovem inevitavelmente, redução na motilidade e causam danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais nos espermatozóides.

No início da incubação a 37°C (Tabela 1), já era possível verificar uma queda gradativa na motilidade espermática, quando comparados os tempos de resfriamento, independente da época e do diluidor testados ($P < 0,05$). Este comportamento também foi observado após 60 e 120 minutos de incubação. Aos 5 minutos, os valores de VIG e MOT no diluidor ACP-102 durante a época chuvosa foram: 3,89 e 73,54%; 3,59 e 64,50% e 3,31 e 56,25% após 2, 24 e 48 horas de conservação, respectivamente. Durante a época seca, os valores encontrados foram: 3,80 e 79,58%; 3,01 e 70,41% e 2,67 e 56,04%. Estes resultados foram superiores aos observados por BRAZ (2003) no sêmen diluído em ACP-102 e resfriado a 4 °C por 2 horas (2,53 e 51,67%) e 24 horas (1,97 e 41,81%).

Acredita-se que os resultados superiores obtidos neste estudo devam-se à adição do crioprotetor gema de ovo aos diluidores testados, promovendo uma maior proteção às células espermáticas. A fração lipoprotéica de baixa densidade da gema de ovo é a fonte de proteção do espermatozóide ovino contra os efeitos do armazenamento a 5°C (WATSON & MARTIN, 1975; MOUSSA et al., 2002). Esta ação benéfica também pôde ser observada por FIGUEIRÊDO et al. (2001), que estudaram o uso da ACIN, previamente criopreservada em nitrogênio líquido e adicionada de 2,5% de gema de ovo para o resfriamento do sêmen ovino a 4°C. Os autores constataram que os espermatozóides ainda encontravam-se viáveis, mesmo após 72 horas.

No presente estudo, o diluidor ACIN apresentou valores de VIG e MOT superiores a 3,0 e 50%, respectivamente, o que significa que manteve as amostras de sêmen em melhores condições que o ACP-102 durante todo o TTR (5, 60 e 120 minutos), até mesmo nas amostras conservadas por 48 horas. Segundo MILCZEWSKI et al. (2000), com os resultados do TTR é possível determinar por meio da avaliação dos espermatozóides, a habilidade e capacidade de cada diluidor em fornecer um meio de nutrição e manutenção do pH, compatíveis com a sobrevivência espermática em temperaturas que não diminuem seu metabolismo.

Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as épocas chuvosa e seca, quanto ao parâmetro VIG, com resultados superiores obtidos na época chuvosa. No diluidor ACP-102, este comportamento foi verificado a partir de 24 horas de conservação em diante, durante todo o TTR. Já no diluidor ACIN, a partir dos 60 minutos do TTR e somente nas amostras conservadas por 24 horas. Com relação à MOT, as épocas não diferiram. Este resultado está de acordo com aquele obtido por CAMPOS (2003), ao estudar o sêmen caprino lavado e não-lavado, diluído em água de coco *in natura* com adição de 2,5 % de gema e resfriado a 4°C por até 72 horas. Com o objetivo de avaliar a sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês nas condições climáticas do Distrito Federal, MARTINS et al. (2003) também não observaram variação da motilidade devido à época do ano.

De acordo com os resultados observados neste estudo, a época de colheita pode afetar a motilidade do sêmen ovino, apesar de não inviabilizar sua utilização na época seca. Isto sugere a possibilidade dos animais sofrerem estresse calórico nesta época, devido ao aumento da temperatura ambiente, já que no caso do presente estudo não tiveram a sua alimentação afetada pela falta de chuva, pois encontravam-se estabulados.

A TDM do sêmen diluído em ACP-102 diferiu significativamente ($P < 0,05$) entre as épocas do ano. Nas amostras conservadas por 48 horas, as da época seca apresentaram maior degradação, 27,65% do que as da época chuvosa, 12,04%. Com relação aos tempos de resfriamento, observou-se que os valores da TDM para as amostras diluídas em ACP-102 durante a época seca, mantiveram-se estáveis por até 24 horas e que às 48 horas, um significativo aumento neste parâmetro foi verificado. Este resultado foi contrário ao relatado por CAMPOS et al. (2004), onde no último tempo de resfriamento, 72 horas, durante a época seca, observou-se uma menor degradação. Não foram observadas diferenças significativas entre os diluidores testados neste estudo quanto à TDM, conforme foi também observado por FIGUEIRÊDO (2002), ao trabalhar com sêmen caprino resfriado em diluidores à base de água de coco *in natura*.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a água de coco em pó (ACP-102) poderá tornar-se uma alternativa para diluição e resfriamento do sêmen ovino a 4°C, pois manteve uma sobrevivência espermática por até 48 horas, comparável à água de coco *in natura*.

A época seca do ano, nas condições do Estado do Ceará, influi negativamente sobre o vigor espermático, porém não inviabiliza sua utilização.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAZ, V.B. *Influência do diluidor, da temperatura de conservação e da taxa de diluição sobre a sobrevivência espermática in vitro do sêmen ovino resfriado*. 2003.

73p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

BRAZ, V.B.; ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F.; MACHADO, V.P.; MOURA, A.A.A.; OLIVEIRA, K.P.L. Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 27, n. 3, p. 328-329, 2003.

CAMPOS, A.C.N. *Morfometria do trato genital masculino: influência do plasma seminal obtido em época seca ou chuvosa sobre espermatozóides caprinos*. 2003. 85p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W.U.; FIGUEIRÊDO, E.L.; PINHEIRO, J.H.T.; FERREIRA, M.A.L.; ARAÚJO, A.A. Viabilidade do sêmen caprino lavado e não lavado diluído em água de coco, resfriado e armazenado a 4 °C. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Rio de Janeiro, v.11, n.3, p. 178-182, set./dez., 2004.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990, 194p.

FIGUEIRÊDO, E. L.; MONTEIRO, A.W.U.; SILVA FILHO, A.H.S.; CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F. Avaliação in vitro do sêmen ovino resfriado diluído em água de coco previamente criopreservada em nitrogênio líquido. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.25, n.2, p. 428-429, 2001.

FIGUEIRÊDO, E. L. *Viabilidade in vitro e in vivo do sêmen caprino diluído em água de coco e resfriado a 4 °C*. 2002. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

FLORES, M.G.; NUNES, J.F.. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino diluído em água de coco *in natura* adicionada da fração ativa “JIP”. *Ciência Animal*, Fortaleza, v. 2, n.2, p. 115-125, 1992.

MARTINS, R.D.; McMANUS, C.; CARVALHÊDO, A.S.; BORGES, H.V.; SILVA, A.E.D.F.; SANTOS, N.R. Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, supl.1, n.6, p.1594-1603, 2003.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 42, p. 55-65, 1996.

MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes, *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.5, p.29-33, 2000.

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

PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; PERÉZ-PÉ, R.; BERG, K.A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, New York, v. 57, p. 823-836, 2002.

SALAMON, S.; ROBINSON, T.J. Studies on the artificial insemination of Merino sheep. II The effects of semen diluents and storage on lambing performance. *Australian Journal of Agricultural Research*, Collingwood, v. 13, p.271-281, 1962.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.37, p.185-249, 1995.

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

SILVA, A.E.D.F.; NUNES, J.F. Estacionalidade na atividade sexual e qualidade do sêmen nos ovinos deslanados das raças Santa Inês e Somalis. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.8, p. 207-214, 1984.

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 °C. *Australian Journal of Biological Sciences*, Collingwood, v.28, p. 145-152, 1975.

Tabela 1: Vigor (VIG) e motilidade (MOT) do sêmen ovino diluído em ACIN e ACP-102 e resfriado por até 48 horas, após 5 minutos de teste de termorresistência (TTR), durante as épocas chuvosa e seca.

Época	Diluidor	Tempo de Resfriamento					
		VIG (0-5)			MOT (%)		
		2 h	24 h	48 h	2 h	24 h	48 h
Chuvosa	ACIN	4,36 ± 0,22 ^{a1}	4,16 ± 0,36 ^{a1}	3,71 ± 0,35 ^{a2}	83,85 ± 9,41 ^{a1}	75,62 ± 10,65 ^{a1,2}	67,18 ± 11,93 ^{a2}
	ACP-102	3,89 ± 0,30 ^{bA}	3,59 ± 0,24 ^{bB*}	3,31 ± 0,24 ^{bB*}	73,54 ± 12,33 ^{bA}	64,50 ± 14,28 ^{bA,B}	56,25 ± 10,18 ^{bB}
Seca	ACIN	4,39 ± 0,25 ^{a1}	3,88 ± 0,38 ^{a2}	3,56 ± 0,42 ^{a3}	83,12 ± 10,44 ¹	78,64 ± 12,19 ^{1,2}	71,97 ± 13,23 ^{a2}
	ACP-102	3,80 ± 0,38 ^{bA}	2,67 ± 0,62 ^{bC**}	2,67 ± 0,62 ^{bC**}	79,58 ± 11,84 ^A	70,41 ± 14,43 ^A	56,04 ± 21,28 ^{bB}

^{a,b1} letras diferentes, comparação entre os diluidores ACIN e ACP-102 (P<0,05);

^{1,2,3} números diferentes, comparação entre o diluidor ACIN (2, 24 e 48 h) P<0,05;

^{A,B,C1} letras diferentes, comparação entre o diluidor ACP-102 (2, 24 e 48 h) P<0,05);

^{*,**} asteriscos diferentes, comparação entre as épocas chuvosa e seca (linhas) P<0,05.

Tabela 2: Vigor (VIG) e motilidade MOT) do sêmen ovino diluído em ACIN e ACP-102 e resfriado por até 48 horas, após 60 minutos de teste de termorresistência (TTR), durante as épocas chuvosa e seca.

Época	Diluidor	Tempo de Resfriamento					
		VIG (0-5)			MOT (%)		
		2 h	24 h	48 h	2 h	24 h	48 h
Chuvosa	ACIN	4,29 ± 0,30 ^{a1}	4,10 ± 0,37 ^{a1*}	3,60 ± 0,38 ^{a2}	79,16 ± 10,07 ^{a1}	73,02 ± 11,56 ^{a1,2}	64,58 ± 12,02 ^{a2}
	ACP-102	3,75 ± 0,30 ^{bA}	3,53 ± 0,28 ^{bA,B*}	3,21 ± 0,34 ^{bB*}	69,79 ± 11,75 ^{bA}	61,14 ± 12,21 ^{bA}	50,83 ± 12,97 ^{bB}
Seca	ACIN	4,27 ± 0,32 ^{a1}	3,77 ± 0,37 ^{a2**}	3,34 ± 0,65 ^{a3}	82,18 ± 10,04 ¹	75,72 ± 11,62 ^{1,2}	67,33 ± 16,29 ^{a2}
	ACP-102	3,48 ± 0,30 ^{bA}	3,03 ± 0,50 ^{bB**}	2,67 ± 0,52 ^{bC**}	74,89 ± 11,08 ^A	66,06 ± 15,74 ^A	52,02 ± 18,24 ^{bB}

^{a,b1}letras diferentes, comparação entre os diluidores ACIN e ACP-102 (P<0,05);

^{1,2,3}números diferentes, comparação entre o diluidor ACIN (2, 24 e 48 h) P<0,05;

^{A,B,C}letras diferentes, comparação entre o diluidor ACP-102 (2, 24 e 48 h) P<0,05);

^{*,**}asteriscos diferentes, comparação entre as épocas chuvosa e seca (linhas) P<0,05.

Tabela 3: Vigor (VIG) e motilidade (MOT) do sêmen ovino diluído em ACIN e ACP-102 e resfriado por até 48 horas, após 120 minutos de teste de termorresistência (TTR), durante as épocas chuvosa e seca.

Época	Diluidor	Tempo de Resfriamento					
		VIG (0-5)			MOT (%)		
		2 h	24 h	48 h	2 h	24 h	48 h
Chuvosa	ACIN	3,93 ± 0,30 ^{a1}	3,73 ± 0,34 ^{a1*}	3,29 ± 0,36 ^{a2}	73,02 ± 10,85 ^{a1}	66,97 ± 11,14 ^{a1,2}	57,70 ± 10,66 ^{a2}
	ACP-102	3,38 ± 0,34 ^{bA}	3,25 ± 0,29 ^{bA*}	2,92 ± 0,48 ^{bB*}	61,35 ± 13,55 ^{bA}	55,93 ± 12,99 ^{bA}	44,06 ± 10,89 ^{bB}
Seca	ACIN	3,75 ± 0,38 ^{a1}	3,40 ± 0,40 ^{a2**}	3,13 ± 0,52 ^{a2}	76,87 ± 11,83 ¹	72,29 ± 11,75 ^{a1,2}	62,04 ± 13,73 ^{a2}
	ACP-102	3,12 ± 0,41 ^{bA}	2,68 ± 0,53 ^{bB**}	2,39 ± 0,66 ^{bB**}	70,20 ± 10,96 ^A	60,97 ± 14,70 ^{bA}	46,26 ± 19,58 ^{bB}

^{a,b1} letras diferentes, comparação entre os diluidores ACIN e ACP-102 (P<0,05);

^{1,2,3} números diferentes, comparação entre o diluidor ACIN (2, 24 e 48 h) P<0,05;

^{A,B,C} letras diferentes, comparação entre o diluidor ACP-102 (2, 24 e 48 h) P<0,05);

^{*,**} asteriscos diferentes, comparação entre as épocas chuvosa e seca (linhas) P<0,05.

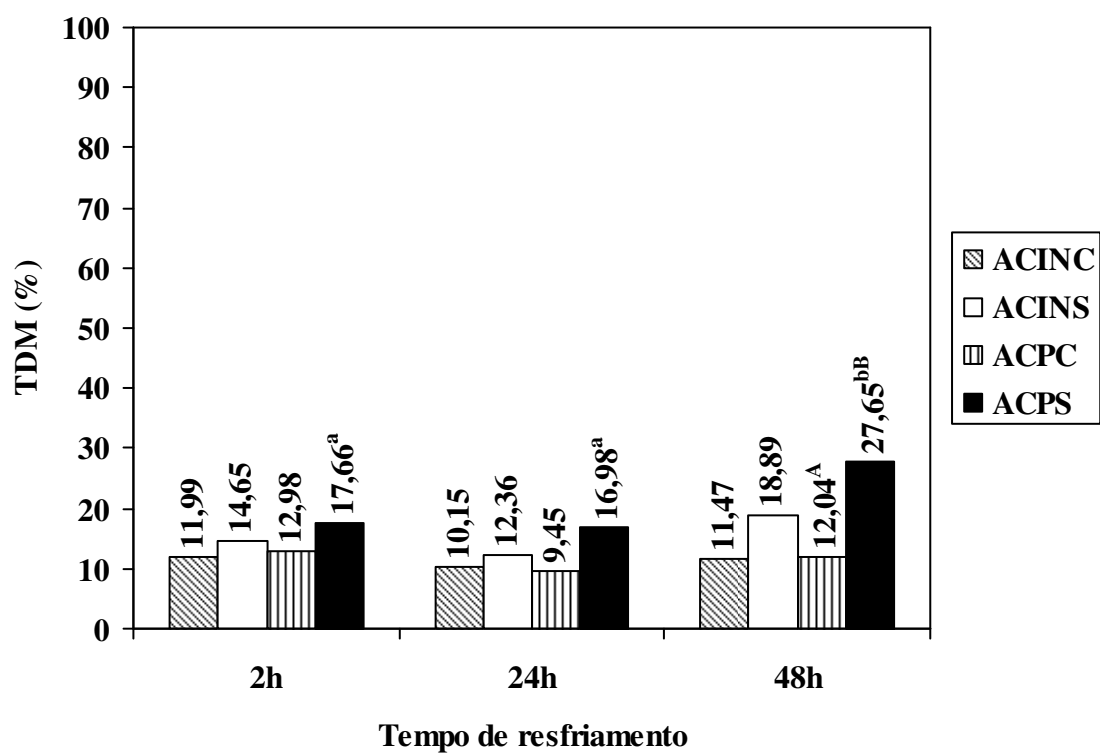


Figura 1: Taxa de degradação da motilidade (TDM) do sêmen ovino diluído em ACIN e ACP-102, durante as épocas chuvosa (ACINC e ACPC) e seca (ACINS e ACPS) e resfriado por até 48 horas.

Artigo submetido ao periódico “**Brazilian Journal of Reproduction
Research and Animal Science**”

**Viabilidade do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco
durante o período chuvoso e seco no Nordeste do Brasil**

(Viability of ovine semen cooled in extenders based in coconut water during the rainy
and dry season in the Northeast of Brazil)

Emmanuelle Lima de Figueirêdo; José Ferreira Nunes; Ana Cláudia Nascimento
Campos; Airton Alencar de Araújo; Marina Albuquerque Cordeiro; Priscila Teixeira
de Souza; Renato Nogueira Diógenes Filho; Regiane Rodrigues dos Santos; José
Valmir Feitosa

Viabilidade do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco durante o período chuvoso e seco no
Nordeste do Brasil

Emmanuelle Lima de Figueirêdo¹; José Ferreira Nunes¹; Ana Cláudia Nascimento Campos²; Airton Alencar de Araújo¹; Marina Albuquerque Cordeiro¹; Priscila Teixeira de Souza¹; Renato Nogueira Diógenes Filho¹; Regiane Rodrigues dos Santos¹; José Valmir Feitosa²

¹ Universidade Estadual do Ceará – UECE

² Universidade Federal do Ceará - UFC

¹ Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UECE, Campus do Itaperi, Av. Paranjana, 1700, CEP:60.740-000, Fortaleza-CE, E-mail: lukafig@yahoo.com;

Viabilidade do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco durante o período chuvoso e seco no Nordeste do Brasil

Viability of ovine semen cooled in extenders based in coconut water during the raining and dry season in the Northeast of Brazil

INTRODUÇÃO

Em regiões tropicais, os efeitos sobre a reprodução da espécie são devidos às modificações da temperatura ambiente, umidade relativa do ar e pluviosidade. Estas modificações parecem influenciar na disponibilidade e qualidade de pastagens e representam fonte de variação das características do ejaculado⁸.

Como agravante, após a diluição e resfriamento ocorrem danos provocados nas células espermáticas que reduzem a motilidade e rompem a integridade das membranas dos espermatozóides. Estas alterações^{5, 12} interferem na sobrevivência e capacidade fecundante dos espermatozóides de forma significativa. Como os efeitos prejudiciais da conservação são menos pronunciados no resfriamento do que na congelação⁵, o sêmen resfriado¹¹ pode ser uma alternativa ao sêmen congelado, desde que utilizado num curto espaço de tempo após a coleta.

Na tentativa de melhorar a conservação do sêmen ovino durante o resfriamento, diversos diluidores têm sido testados. Entre eles, a água de coco⁹ *in natura* que apresentou um bom desempenho, comparável a diluidores tradicionais como o leite. Com o intuito de simplificar a utilização da água de coco como diluidor, Salgueiro et al. (2002)¹³ padronizaram este diluidor na forma de pó, constituindo o produto ACP-102, para uso na espécie ovina.

Este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a viabilidade do sêmen ovino resfriado a 4°C por até 48 horas em água de coco *in natura* e pó (ACP-102), durante a época chuvosa e seca no Nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO) da Universidade Estadual do Ceará, em Fortaleza - CE, que está situada em uma planície litorânea a 3°45'47" de latitude sul e 38°30'37" de longitude oeste.

Foram utilizados quatro machos ovinos da raça Santa Inês com idade média de um ano, submetidos a manejo intensivo de criação. O sêmen dos animais foi coletado por meio de vagina artificial, uma vez por

semana nas épocas chuvosa (fevereiro a abril) e seca (outubro a dezembro), perfazendo um total de 48 ejaculados por época.

Foram testados dois diluidores elaborados conforme protocolo a seguir: ACIN- 50 ml de água de coco *in natura* filtrada + 50 ml de solução de citrato de sódio a 2,5% e ACP-102 – água de coco em pó diluída em 100 ml de água destilada. Foram retirados 3,0% do volume total dos diluidores e acrescentada a mesma quantidade de gema de ovo.

Após a colheita, o sêmen de cada reprodutor foi avaliado quanto ao volume (ml), motilidade massal (escore de 0-5) e concentração espermática ($\times 10^9$ spz/ml). Em seguida, o sêmen foi dividido em duas alíquotas (dentro de tubos de ensaio) que foram diluídas em ACIN e ACP-102 (concentração final de 200×10^6 spz/ml), previamente aquecidos a 37°C em banho-maria. Os tubos de ensaio contendo as amostras foram acondicionados em geladeira, dentro de beakers contendo um pouco de água de torneira até que a temperatura atingisse 4°C.

Amostras do sêmen resfriado foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR) por 120 minutos em banho-maria a 37°C e a cada meia hora de incubação foram avaliadas quanto ao vigor e motilidade. Estas avaliações foram processadas após 2, 24 e 48h de resfriamento. Também foram realizadas avaliações da morfologia espermática, através de esfregaços de sêmen corados com uma solução à base de eosina 1%, nigrosina 3% e citrato de sódio 3% no início e término da incubação. Foram observadas 200 células por meio de microscopia óptica no aumento de 1000X. As anormalidades¹ foram classificadas em: anormalidade de cabeça (AC), defeito de peça intermediária (DPI), gota citoplasmática proximal (GCP), gota citoplasmática distal (GCD) e anormalidade de flagelo (AF).

Os parâmetros de vigor, motilidade e morfologia, nos diferentes tempos de conservação (2, 24 e 48h) e diluidores testados (ACIN e ACP-102), foram expressos em média e desvio padrão e submetidos ao teste Tukey, utilizando-se um delineamento em parcelas subdivididas ($P < 0,05$). Os ejaculados foram considerados repetições para cada tempo de conservação e diluidor testado (The SAS System, 8.0) .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de viabilidade do sêmen ovino resfriado a 4°C por 48 horas em água de coco *in natura* e ACP-102 e submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, estão expressos na Fig. 1 e Fig.2.

A avaliação do vigor (Fig. 1) durante o teste de termorresistência (TTR) revelou haver diferença estatística ($P < 0,05$) entre as épocas, nas amostras diluídas em ACP-102 (ACPC e ACPS), com valores inferiores a 3,0 observados na época seca (ACPS) desde o início da incubação. Durante a primeira hora de TTR, o ACPS

apresentou-se estável, declinando a partir da segunda hora. Os demais tratamentos (ACINC, ACPC, ACINS) apresentaram um declínio lento e progressivo durante todo o TTR.

Estes resultados estão de acordo com as observações de Paganini et al.¹⁰ (1997) e de Milczewski et al.⁶ (2000), que verificaram declínio linear com o avanço do período de estocagem durante o teste de exaustão. Este fato pode ser explicado em função dos espermatozóides utilizarem mais os seus substratos nutritivos e diminuírem sua viabilidade durante as duas primeiras horas do teste.

Com relação à motilidade (Fig. 2), tanto na época chuvosa (ACINC e ACPC) quanto na seca (ACINS e ACPS), os diluidores ACIN e ACP-102 apresentaram comportamento semelhante. Os maiores valores foram observados nas amostras diluídas em ACIN, durante todo o TTR. Até os 60 min de incubação, ambos diluidores, independente da época, apresentaram valores superiores a 50%, porém mesmo no final do TTR somente o diluidor ACIN (época chuvosa e seca) ainda apresentava motilidade próxima a 60%.

Segundo o CBRA² (1998), dentre os demais padrões seminais, os valores desejáveis para a seleção de carneiros para a monta natural são: MOT = 70% e VIG = 3. Portanto, no presente trabalho, somente a média geral de VIG encontra-se de acordo com estas recomendações. No entanto, de acordo com Moraes⁷ (1997) o sêmen de ovinos aptos para a cobertura deve apresentar MOT > 50% e VIG > 2, estando a média geral encontrada no presente estudo de acordo com esta recomendação.

Com os resultados do TTR⁶ foi possível determinar, por meio da avaliação dos espermatozóides, a habilidade e capacidade de cada diluente em fornecer um meio de nutrição e manutenção do pH, compatíveis com a sobrevivência dos espermatozóides em temperaturas que não diminuem seu metabolismo.

Conforme foi observado na motilidade espermática, na morfologia (Tab.1) a época chuvosa teve menor efeito sobre os espermatozóides normais conservados por 48h em ACP-102. Durante a época seca, verificou-se redução no número de células normais após 48h de resfriamento, enquanto que o parâmetro anormalidade de cabeça (AC) apresentou um comportamento inverso. Já a anormalidade de flagelo manteve-se estável.

Estudando a produção de sêmen ovino em diferentes épocas do ano no Estado do Rio Grande do Sul, Selaive-Villarreal et al.¹⁴ (1985) observaram a influência da época do ano sobre a porcentagem de espermatozóides anormais, como foi constatado neste estudo. Já Freitas e Nunes³ (1992), não verificaram diferença entre as épocas seca e chuvosa do Nordeste brasileiro, apesar dos valores de patologia espermática sempre tenderem a ser mais observados na época seca.

Somente foram observados espermatozóides com anormalidades de cabeça (AC) e de flagelo (AF), pois neste experimento, as demais alterações na morfologia espermática foram muito pouco encontradas. O efeito do diluidor utilizado (ACIN ou ACP-102), a época do ano e o tempo de conservação sobre a morfologia, só foram verificados a partir de 48h de conservação.

Dentre as patologias espermáticas observadas no presente estudo, o número de espermatozóides com anormalidade de cabeça apresentou aumento durante a época seca, após 48h de resfriamento, indicando um processo de desestabilização da estrutura das células espermáticas, enquanto que o número de anormalidades de flagelo manteve-se estável. Este resultado foi contrário ao obtido por Milczewski et al.⁶ (2000), que verificaram aumento na percentagem de espermatozóides com flagelo enrolado no sêmen ovino resfriado por 8h. Martins et al.⁴ (2003), observaram além de anormalidades de cabeça, anormalidades de peça intermediária.

Conclui-se que o diluidor ACP-102 apresenta boa capacidade conservadora, pois apesar de estatisticamente inferiores, os valores observados no sêmen ovino resfriado por até 48h durante o TTR, foram próximos àqueles obtidos com o diluidor à base de água de coco *in natura*. De acordo com este estudo, a época chuvosa demonstrou exercer menor influência sobre as características de motilidade e morfologia espermáticas no Nordeste do Brasil, dependendo do diluidor utilizado, o que não impede que o sêmen ovino seja coletado durante a época seca, devendo-se levar em consideração a menor viabilidade quanti-qualitativa das células espermáticas nesta época do ano.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

Tabela 1: Número de espermatozóides normais (N), anormalidades de cabeça (AC) e de flagelo (AF) do sêmen ovino diluído em ACIN e ACP-102 e resfriado por até 48 horas, após 5 e 120 minutos de teste de termorresistência (TTR), durante as épocas chuvosa e seca. Fortaleza (CE), 2004.

Tempo de Resfriamento	Tratamento	Época do ano					
		Chuvosa			Seca		
		N (n°)	AC (n°)	AF (n°)	N (n°)	AC (n°)	AF (n°)
2h	ACIN	186,82 ± 8,99	5,30 ± 4,34	7,87 ± 8,33	185,05 ± 15,65	3,16 ± 3,32	11,78 ± 14,77
	ACP-102	187,69 ± 8,90	5,16 ± 5,43	7,13 ± 7,66	187,21 ± 11,16 ¹	4,43 ± 5,44 ¹	8,34 ± 8,46
24h	ACIN	185,02 ± 10,91	5,92 ± 4,89	9,05 ± 9,85	183,50 ± 16,31	4,29 ± 4,10	12,20 ± 15,08
	ACP-102	186,85 ± 10,48	5,60 ± 5,90	7,54 ± 8,63	185,68 ± 4,35 ¹	5,86 ± 8,99 ¹	8,44 ± 9,85
48h	ACIN	183,45 ± 9,54	4,76 ± 4,17	11,78 ± 9,88	176,83 ± 39,73	3,27 ± 3,38 ^a	11,56 ± 13,84
	ACP-102	186,31 ± 8,35 ^A	4,76 ± 3,72 ^A	8,92 ± 8,47	174,17 ± 40,62 ^{2,B}	9,39 ± 14,64 ^{b,2,B}	8,09 ± 8,36

^{a,b}letras diferentes, comparação entre os diluidores ACIN e ACP-102 (P<0,05);

^{1,2,3}números diferentes, comparação entre o diluidor ACP-102 (2, 24 e 48 h) P<0,05;

^{A,B}letras diferentes, comparação entre as épocas chuvosa e seca (colunas) P<0,05.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperm chez le bélier Ile-de-France I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition Development**, v.20, n.6, p.1789-99, 1980.
- 2- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. Belo Horizonte: 1998, 49p.
- 3 - FREITAS, V.J.F.; NUNES, J.F. Parâmetros andrológicos e seminais de carneiros deslanados criados na região litorânea do Nordeste Brasileiro em estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 16, n. 3-4, p. 95-104, 1992.
- 4 - MARTINS, R.D.; McMANUS, C. CARVALHÊDO, A.S.; BORGES, H.V.; SILVA, A.E.D.F.; SANTOS, N.R. Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Supl. 1, v.32, n.6, p.1594-1603, 2003.
- 5 - MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.
- 6 - MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes, **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.29-33, 2000.
- 7 - MORAES, J.C.F. Avaliação reprodutiva do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.1, p.10-9, 1997.
- 8 - NUNES, J.F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6., Belo Horizonte, 1985. **Anais**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1985. p. 329-42.
- 9 - NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e de suas frações ativas como diluidor de sêmen de mamíferos domésticos. **Ciência Animal**, v.2, p.15-21, 1995.
- 10 - PAGANINI FILHO, P.; BICUDO, S.D.; SOUZA, M.I.L.; SOUSA, D.B. Viabilidade do sêmen ovino frente a três diluidores em temperaturas de 37 °C e sob refrigeração. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.2, p.61-6, 1997.
- 11 - PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; PERÉZ-PÉ, R.; BERG, K.A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 823-36, 2002.
- 12 - SALAMON, S.; ROBINSON, T.J.. Studies on the artificial insemination of Merino sheep. II The effects of semen diluents and storage on lambing performance. **Journal Agriculture Research**, v. 13, p.271-81, 1962.

13 - SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.E.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à 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. 96-8, 2002.

14 - SELAIVE-VILLARROEL, A.B.; MIES FILHO, A.; JOBIM, M.I.M. Estudo sobre produção de sêmen em carneiros. 1) Efeito da época do ano. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 9, n.4, p. 166-9, 1985.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a viabilidade do sêmen ovino resfriado a 4°C em água de coco *in natura* e em pó (ACP-102), durante a época chuvosa e seca no Nordeste do Brasil. O sêmen de quatro carneiros foi colhido e dividido em duas alíquotas para diluição em água de coco *in natura* e em ACP-102. As amostras foram acondicionadas em geladeira a 4°C e após 2, 24 e 48 horas de resfriamento foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR), para avaliação do vigor (VIG) e motilidade (MOT) aos 5, 60 e 120 minutos de incubação (37°C). Esfregaços de sêmen foram realizados no início e fim do TTR para avaliação da morfologia espermática (ME). Os parâmetros de VIG, MOT e ME, nos diferentes tempos de conservação (2, 24 e 48h) e diluidores testados (ACIN e ACP-102), foram expressos em média e desvio padrão e submetidos ao teste Tukey ($P<0,05$). Verificou-se diferença significativa ($P<0,05$) entre os diluidores ACIN e ACP-102 quantos aos parâmetros de VIG e MOT. Conforme foi observado na motilidade espermática, na morfologia a época chuvosa teve menor efeito sobre os espermatozóides normais conservados por 48h em ACP-102. Conclui-se que o diluidor ACP-102 apresenta boa capacidade conservadora. De acordo com este estudo, a época chuvosa demonstrou exercer menor influência sobre as características de motilidade e morfologia espermáticas.

UNITERMOS: Sêmen, Ovino, Diluidor, Resfriamento.

SUMMARY

The aim of this work was evaluate *in vitro* the viability of ram semen cooled to 4°C in coconut water *in natura* and in powder (ACP-102) during the rainy and dry season in the Northeast of Brazil. The semen of four rams was collected and divided in two portions to be diluted in coconut water *in natura* and ACP-102. The samples were conditioned in refrigerator to 4°C and after 2, 24 and 48 hours of cooling were submitted at thermoresistance test (TT), to evaluation of vigor (VIG) and motility (MOT) at 5, 60 and 120 minutes of incubation (37°C). Semen slides were executed in the beginning and in the end of TT to evaluation of the spermatic morphology (SM). VIG, MOT and MDR parameters, within different preservation times (2, 24 and

48h) and extenders (CWIN and ACP-102), were expressed in media and standard deviation (SD) and submitted to Tukey test ($P < 0.05$). In regard to VIG and MOT, there were observed statistical differences between extenders CWIN and ACP-102. According to was observed in the spermatic motility, in the morphology the rainy season had less effect on the normal spermatozoa preserved for 48h in ACP-102. In conclusion, the ACP-102 extender present good preserve capacity. Agreed with this study, the raining season presented less influence on the characteristics of spermatic motility and morphology.

UNITERMS: Semen, Ovine, Extender, Cooling.

Viabilidade do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco durante o período chuvoso e seco no Nordeste do Brasil

Emmanuelle Lima de Figueirêdo

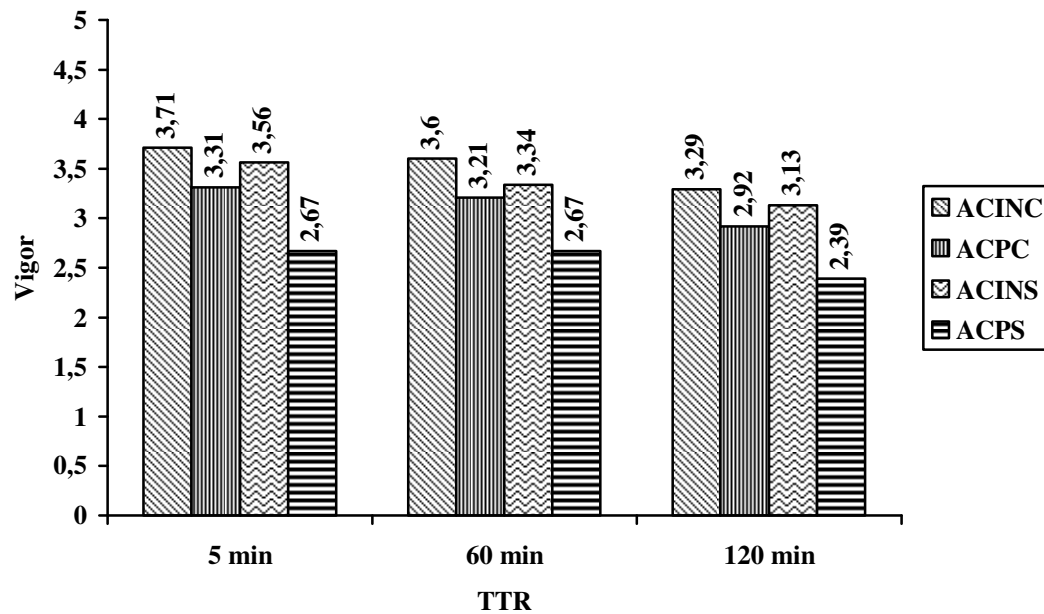


Figura 1 – Vigor (0-5) durante o TTR do sêmen ovino resfriado a 4 °C por 48h em água de coco em *in natura* e em pó obtido na época chuvosa (ACINC e ACPC) e seca (ACINS e ACPS).

Viabilidade do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco durante o período chuvoso e seco no Nordeste do Brasil

Emmanuelle Lima de Figueirêdo

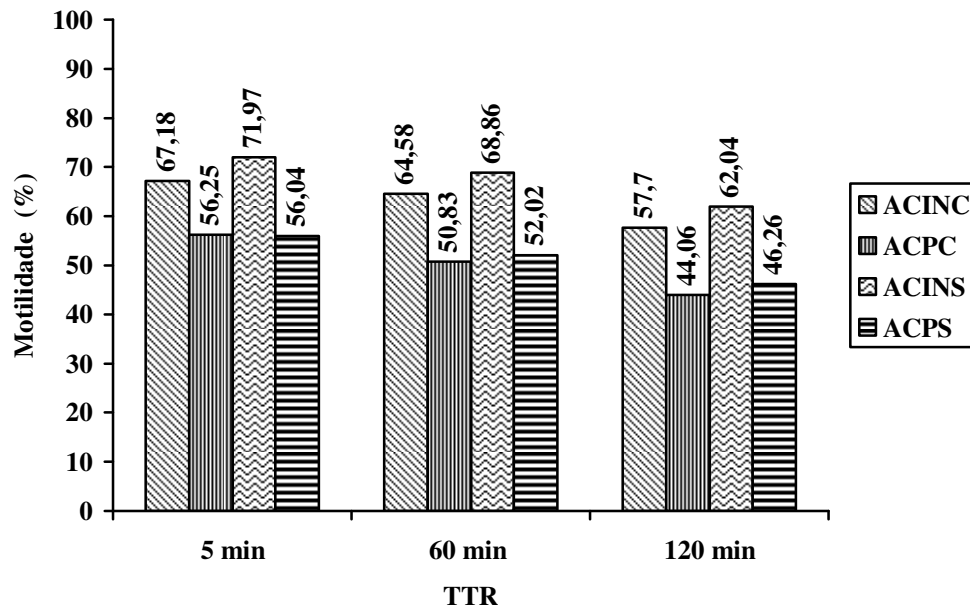


Figura 2 – Motilidade (0-100%) durante o TTR do sêmen ovino resfriado a 4 °C por 48h em água de coco em *in natura* e em pó obtido na época chuvosa (ACINC e ACPC) e seca (ACINS e ACPS).