Universidade Estadual do Ceará

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Faculdade de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Viabilidade *In Vitro* e *In Vivo* do Sêmen Caprino Diluído em Água de Coco e Resfriado a 4ºC

Emmanuelle Lima de Figueirêdo

Fortaleza-Ceará

2002

Universidade Estadual do Ceará

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Faculdade de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Viabilidade e *In Vitro* e *In Vivo* do Sêmen Caprino Diluído em Água de Coco e Resfriado a 4ºC

Emmanuelle Lima de Figueirêdo

Dissertação apresentada à Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes

Fortaleza-Ceará

2002

F 475v Figueirêdo, Emmanuelle Lima de.

Viabilidade *in vitro* e *in vivo* do sêmen caprino diluído em água de coco e resfriado a 4ºC/ Emmanuelle Lima de Figueirêdo. – 2002.

45p; 29,7 cm

Orientador: José Ferreira Nunes

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

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

CDD 636.08926

Universidade Estadual do Ceará

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Faculdade de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Viabilidade *In Vitro* e *In Vivo* Sêmen Caprino Diluído em Água de Coco e Resfriado a 4ºC

Emmanuelle Lima de Figueirêdo

APROVADA EM 19/12/2002

Banca examinadora:

_____

Prof. Dr. José Ferreira Nunes
Orientador

_____

Prof. Dr. Rômulo José Vieira
Co-orientador/Examinador

_____

Prof. Dr. Arlindo Alencar Araripe
Examinador

_____

Prof. Dr. Airton Alencar Araújo
Co-orientador

Aos amores da minha vida:
Meus pais Jackson e Neli, por minha formação como pessoa;
Meus irmãos Jane, Jackson e Eduarda, pela amizade e
Meu noivo Marcius. pelo apoio e companheirismo

Dedico

AGRADECIMENTOS

A 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;

À CAPES, pela bolsa de estudos que me foi concedida;

Ao Dr. José Ferreira Nunes, pela confiança e respeito que vem depositando em mim e por me dar a honra de continuar sendo sua orientanda;

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

Aos companheiros de laboratório, Audália Carvalho, Alexandre Monteiro, Joaquim Pinheiro, Benicio Diógenes, Artur Henrique da Silva Filho, Ângelo Palácio, Marina Cordeiro, Débora Magalhães e Vanessa Machado, por serem sempre tão prestativos e amigos;

A todos os professores e funcionários do PPGCV, pelo respeito com que sempre me trataram;

Ao Dr. Ricardo Toniolli e Dr. Airton Alencar Araújo, pelos ensinamentos;

Aos colegas da pós-graduação, Marcílio, Carol, Helena, Ana Paula, Roberta, Marquinhos, Evelyn e Dárcio, pelo companheirismo;

A todos meus colegas da turma de mestrado, em especial: Sâmia, Faviano, Regiane e Isaac;

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

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade *in vitro* e *in vivo* do sêmen caprino resfriado diluído em água de coco (AC) adicionada de gema de ovo (GO) e glicerol (GL). Foram preparados dois tratamentos: 1) AC + GO e 2) AC + GO + GL. Ejaculados foram diluídos e resfriados a 4ºC por até 48h. Amostras foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR) e avaliadas quanto à motilidade individual progressiva (MIP) e porcentagem de espermatozóides móveis (PEM). A taxa de degradação da motilidade (TDM) foi calculada ao final da incubação. Esfregaços de sêmen foram realizados para avaliação da morfologia espermática (ME). Resultados significativos superiores (P<0,05) foram encontrados no diluidor sem GL, para os parâmetros de MIP, PEM, TDM e ME, dentro de cada tempo de resfriamento e de incubação. Para avaliação da fertilidade, cabras foram sincronizadas. Ejaculados foram diluídos em AC acrescida de GL e GO e resfriados a 4 ºC por 12h e 24 h. Inseminaram-se 155 fêmeas com sêmen resfriado por 12h e 200 com sêmen resfriado por 24h. Houve diferença significativa (P<0,05) entre as taxas de fertilidade de 41,29% (60/155) e de 54% (108/200) obtidas após IA com sêmen resfriado por 12 e 24 horas, respectivamente. Concluiu-se que a adição de GL ao sêmen resfriado a 4ºC não desempenha função fisiológica importante já que os valores de MIP e PEM sempre foram inferiores no sêmen contendo GL, porém sua utilização pode contribuir para a manutenção da fertilidade do sêmen caprino resfriado garantido desta forma, bons resultados nos trabalhos com IA.

ABSTRACT

The objective of this work was to verify the viability and fertility of the goat semen cooled and diluted in coconut water (CW) added of egg yolk (EY) and glycerol (GL). Two treatments were prepared: 1) CW + EY and 2) CW + EY + GL. Ejaculated they were diluted and cooled to 4ºC for up to 48 h. Samples were submitted to thermoresistence test (TTR) and evaluated with relationship to the progressive individual mobility (PIM) and percentage of motile spermatozoa (PMS). The mobility degradation rate (MDR) was calculated at the end of the incubation. Semen slides were accomplished for evaluation of sperm morphology (SM). Significatives results higher (P<0,05) were found in the extender without GL, for the parameters of PIM, PMS, MDR and SM, inside of each time of cooling and of incubation. For evaluation of the fertility goats were synchronized. Ejaculated they were diluted in CW added of GL and EY and cooled to 4 ºC for 12 h and 24 h. The 155 females were inseminated with cooled semen for 12 h and 200 with semen cooled for 24 h. There was significative difference (P < 0,05) between the rates of fertility of 41,29% (60/155) and of 54% (108/200) obtained after AI with cooled semen for 12 and 24 hours respectively. In conclusion, the addition of GL to the semen cooled to 4ºC doesn't carry out important physiologic function since the values of PIM and PMS were always inferior in the semen containing glycerol, however your use can contribute to the maintenance of the fertility of the goat semen cooled guaranteed this way, good results in the works with AI.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....
INTRODUÇÃO GERAL.....01
REVISÃO DE LITERATURA.....02
1) Inseminação artificial.....02
2) Tecnologia do sêmen.....03
2.1) Sêmen resfriado.....03
2.2) Temperatura de estocagem do sêmen resfriado.....04
2.3) Constituição dos diluidores.....05
3) Água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos.....07
4) Avaliação do sêmen de pequenos ruminantes.....10
5) Teste de termorresistência (TTR).....11
JUSTIFICATIVA.....13
OBJETIVOS.....14
Objetivo Geral.....14
Objetivos Específicos.....14
EXPERIMENTOS REALIZADOS.....15
Artigo 1.....16
Artigo 2.....32
CONCLUSÕES GERAIS.....38
PERSPECTIVAS.....39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC	Água de coco
AF	Anormalidade de flagelo
ºC	Graus Celsius
DPI	Defeito de peça intermediária
eCG	Gonadadotrofina coriônica equina
GCD	Gota citoplasmática distal
GCP	Gota citoplasmática proximal
GL	Glicerol
GO	Gema de ovo
IA	Inseminação artificial
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
ME	Morfologia espermática
MIP	Motilidade individual progressiva
mL	Mililitros
P	Probabilidade
PEM	Porcentagem de espermatozóides móveis
pH	Potencial de hidrogênio
sptz	Espermatozóides
TDM	Taxa de degradação da motilidade
TTR	Teste de termorresistência

INTRODUÇÃO GERAL

Em busca de alternativas para melhorar a função produtiva e reprodutiva de animais domésticos de interesse econômico, como caprinos e ovinos, pesquisadores de todo o mundo têm procurado desenvolver biotécnicas como a sincronização do estro, a inseminação artificial (com utilização do sêmen fresco, resfriado ou congelado) e a transferência de embriões, que permitam a eficiência máxima de animais de alto padrão genético (NUNES, 1999). Uma das principais biotecnologias utilizadas é a inseminação artificial, considerada uma das mais valiosas práticas de manejo reprodutivo disponível aos criadores (MACHADO & SIMPLÍCIO, 1990).

A técnica de inseminação artificial, seja usando sêmen congelado ou resfriado, tem proporcionado em muitos países, um incremento significativo no melhoramento de seus rebanhos (COLAS, 1984). Pequenos, médios e grandes produtores recorrem à inseminação artificial como técnica usual de manejo reprodutivo, buscando elevar a eficiência e otimizar o retorno econômico da atividade pecuária. Este método propaga os genes com maior rapidez, facilitando assim, uma avaliação eficiente de um indivíduo quando comparada com a monta natural (SCHEID, 1997).

A tecnologia de beneficiamento do sêmen diluído em água de coco, poderá contribuir de maneira significativa para a conservação e multiplicação de animais de alta linhagem, bem como aqueles em vias de extinção. Portanto, tornam-se necessários estudos sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen caprino, diluído em água de coco e resfriado a 4 ºC, visando prolongar a sobrevivência das células espermáticas, permitindo desta forma, seu emprego em longas distâncias, prolongando assim o tempo de uso e com melhores índices de fertilidade.

REVISÃO DE LITERATURA

1) Inseminação artificial

Embora os conhecimentos sobre inseminação artificial (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 & FERNÁNDEZ, 2001).

A IA 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).

Segundo MACHADO & SIMPLÍCIO (1995), a IA pode representar um poderoso instrumento visando aumentar a produtividade numérica e ponderal do rebanho caprino, destacando-se as variáveis:

- melhoramento genético advindo do uso e da multiplicação de sêmen de bodes qualificados como superiores em testes de performance ou progênie;
- preservação de germoplasma de raças ou ecótipos sob risco de extinção;
- controle de doenças sexualmente transmissíveis;
- programação da exploração com o eventual controle do ciclo de produção.

2)Tecnologia do sêmen

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

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

- 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 refrigerado a + 4 ºC, para utilização em um curto espaço de tempo ou congelado a – 196 ºC em nitrogênio líquido, o que favorece a sua conservação por um longo período de tempo, prolongando assim, o seu emprego (NUNES, 1998).

2.1) Sêmen resfriado

O uso do 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). Segundo ROCA et al. (2000), o uso efetivo de sêmen resfriado para inseminação artificial, depende da habilidade do diluidor em promover um ambiente apropriado par o espermatozóide durante sua conservação.

A conservação do sêmen por períodos curtos, depende da redução reversível da motilidade e atividade metabólica dos espermatozóides a temperaturas reduzidas (5 ºC ou 15 ºC ou em dióxido de carbono. (EVANS & MAXWELL, 1987; MAXWELL & SALAMON, 1993; MACHADO & 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 e a uma temperatura de + 5 ºC, por até dez dias em diluente à base de TRIS, associado a 20 ou 25% de gema de ovo.

2.2) Temperatura de estocagem do sêmen resfriado

ROCA et al. (2000) relataram que o sêmen caprino tem sido conservado em temperaturas variando entre 2 a 15 ºC, principalmente entre 4 a 5 ºC. O ritmo de refrigeração do sêmen caprino após diluição, deve estar compreendido entre 0,25 a 0,35 ºC/ min até que seja atingida a temperatura de + 5 ºC, mantendo-se desta forma, a motilidade dos espermatozóides em baixos níveis por alguns dias (MACHADO & SIMPLÍCIO, 1995).

Segundo EVANS & MAXWELL (1987), o período máximo de conservação do sêmen a + 5 ºC, 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 ºC, tanto o sêmen de ovinos como o de caprinos, devem ser utilizados 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 ºC (STOJANOV et al., 1994, citados por MAXWELL & 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 (CO_2) entre 18 a 20 ºC (EVANS & MAXWELL, 1987).

Testes de determinação da motilidade progressiva individual e a porcentagem de espermatozóides móveis, às 2, 4, 6, 8 e 24 horas de incubação a + 15 ºC, mostraram valores distintos para os espermatozóides conservados nos diluidores água de coco e leite (NUNES & COMBARNOUS, 1995).

2.3) 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 a 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 espermatozóides. Os crioprotetores mais comuns utilizados para congelação das células espermáticas incluem glicerol, açúcares (lactose, manose, rafinose , sucrose etc.), gema de ovo e proteínas lácteas (CARNEIRO, 2002).

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). 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 & MAXWELL, 2000).

Embora a gema de ovo venha sendo utilizada para proteger as membranas espermáticas do choque térmico e seja um constituinte comum dos diluidores usados na preservação do espermatozóide de mamíferos a baixas temperaturas (ROCA et al., 1997), 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 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 coleta, aumenta a porcentagem de células vivas e sua motilidade, durante conservação a 5 ºC em diluidores contendo gema de ovo ou leite. No entanto, um estudo sobre os fosfolipídios, antes e depois da congelação, revelou que os lipídios da gema de ovo adicionados ao sêmen diluído, não foram hidrolisados a lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (CHAUAN & ANAND, 1990) e ROCA et al. (1997) demonstraram que o sêmen não lavado de caprinos da raça Murciano-Granadina, pode ser preservado a 5 ºC, após diluição em TRIS com 2% de gema de ovo.

O glicerol e a gema de ovo aceleram mudanças na membrana espermática, levando à reação no acrossoma e/ou morte prematura da célula (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1998). O glicerol ($CH_3H_8O_3$), um álcool polihídrico altamente permeável, cuja atividade crioprotetora foi descoberta em 1949, é o agente mais largamente empregado na criopreservação de sêmen das diferentes espécies (SILVA et al., 2000).

Diversos autores têm utilizado vários crioprotetores intracelulares, como o glicerol, em concentrações variáveis, obtendo resultados divergentes quanto à viabilidade espermática pós-descongelação (SOUZA, 2002). As propriedades permeantes do citrato de sódio presente nos diluidores, favorecem a entrada lenta do crioprotetor glicerol no interior da célula (MIES FILHO, 1987).

A habilidade do glicerol, na transposição da membrana celular, permite a desidratação da célula, através da saída de água por osmose (HAMMERSTDT et al., 1990), evitando a formação de cristais de gelo que poderão promover a ruptura da membrana plasmática do espermatozóide (CARDOSO et al., 2000). 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).

BEDFORD et al. (1995) ao testarem diluidores para o resfriamento de sêmen de garanhões, verificaram que a adição de glicerol aos diluidores leite desnatado e Colorado, aumentou a porcentagem de espermatozóides móveis, particularmente após 48 horas de estocagem a 5 ºC.

3) Água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (MARQUES, 1982). A água proveniente de um coco com seis meses de idade e de variedade verde, apresenta uma osmolaridade em torno de 500 milliosmoles e um pH entre 4,5 e 5, que devem ser corrigidos para que possa ser usada como diluidor (NUNES, 1987). A composição química da água de coco maduro variedade anão é mostrada no Quadro 1.

Segundo NUNES & 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 biotecnologias relacionadas à reprodução animal. Excelentes resultados foram obtidos com a utilização da água de coco em estudos de preservação de sêmen de animais domésticos como caprinos (FREITAS, 1988; TONIOLLI, 1989a; SALLES, 1989; RODRIGUES et al., 1994; NUNES, 1998), ovinos (FREITAS, 1992; CRUZ, 1994; SOUSA et al., 1994), suínos (TONIOLLI, 1989b; TONIOLLI & MESQUITA, 1990) e caninos (SILVA et al., 1998; MONTEZUMA Jr. et al., 1994). Entretanto, até o momento atual, não se tem o domínio dos protocolos de conservação do sêmen, nos quais se utilizam a água de coco como diluidor do sêmen.

Quadro 1. Composição da água de coco anão maduro.

1. Aminoácidos	**µg/ml**
Alanina	177,1
Aminobutírico	168,8
Arginina	16,8
Asparagina	10,4
Aspártico	5,4
Fenilalanina	10,2
Glicina	13,9
Glutâmico	78,8
Glutamina	13,4
Histidina, Metionina e Hidroxiprolina	Traços
Homoserina	5,2
Leucina	31,7
Lisina	22,5
Prolina	21,6
Serina	65,8
Tirosina	3,1
Treanina	26,3
Valina	15,1s
2. Açúcares	
Frutose	8,9
Glicose	2,46
Sacarose	2,51
3. Vitaminas	
Ácido fólico	0,003
Ácido nicotínico	0,64
Ácido pantotenico	0,52
Biotina	0,02
Riboflavina	0,01
Tiamina e Piridoxina	Traços
4. Minerais	
Cálcio	Traços
Cloro	183,0
Cobre	0,04
Enxofre	24,0
Ferro	0,10
Fósforo	37,0
Magnésio	30,0
Potássio	312,0
Sódio	105,0

Fonte: Nunes & Combarnous (1995).

Muitas dificuldades têm sido encontradas, particularmente com a congelação do sêmen de caprinos. É conhecido que durante a estação não sexual, em clima temperado, o plasma seminal deprime fortemente a motilidade individual e a porcentagem de espermatozóides móveis, colhidos, congelados na estação sexual e descongelados na estação não sexual (NUNES, 1980).

NUNES (1982) demonstrou que esse efeito deletério do plasma seminal na estação não sexual, provém das glândulas bulbouretrais que durante essa estação tornam-se hipertrofiadas e secretam grandes quantidades de fosfolipases do tipo A. Este efeito é exacerbado quando há interação entre as enzimas fosfolipases e fosfolipídios presentes no plasma seminal e no meio diluidor, como o leite, respectivamente. Portanto, diluidores pobres em fosfolipídios poderiam ser a solução deste problema, evitando ou reduzindo os efeitos negativos causados pela fosfolipase A sobre o sêmen de animais desta espécie (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 refere-se ao vigor e motilidade de espermatozóides móveis e fertilidade (NUNES, 1986). 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. (2001a) verificaram que a associação da água de coco com o leite, favoreceu a motilidade individual progressiva (MIP) e a porcentagem de espermatozóides móveis (PEM) no teste de termorresistência, quando comparado ao diluidor leite desnatado puro, 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, aumentando a 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 + 4ºC, 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, 1988).

LAGUNA (1996) relatou que a água de coco poderia sofrer alterações em sua composição, de acordo com o estágio de maturação do fruto ou ainda 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.

4) Avaliação do sêmen de pequenos ruminantes

Uma avaliação completa de sêmen deve ser realizada para indicar animais sub-férteis, inférteis ou estéreis. O sêmen deve ser coletado por meio de vagina artificial e avaliado em microscópio, quanto às suas características físicas e morfológicas (MAIA, 2002). De acordo com 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 espectofotômetro 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): 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;

- Percentagem de espermatozóides móveis (PEM): percentagem 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: a porção de espermatozóides patológicos (sem cauda, com cauda dupla, com dupla cabeça etc.) dentro da população espermática, não devendo ultrapassar os 15% (caprinos) e 20% (ovinos).

5) Teste de termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência tem sido empregado por vários autores par predizer a fertilidade de machos em várias espécies (touro, cachaço, carneiro) 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 espermatozóides precisam de várias horas após a ejaculação ou inseminação artificial para atingir o local de fecundação na fêmeas (HAFEZ, 1995). Seu poder fecundante, está consequentemente, em parte ligado a sua sobrevivência no trato 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. 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 concentração compreendida entre 80 e 300 x 10^6 sptz/ml, e colocado em banho-maria à 37 - 38ºC (MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DE SÊMEN ANIMAL, 1998). A percentagem de células móveis e motilidade pode ser calculada ao início do teste e 2 – 3 horas após a incubação (BARIL et al., 1993).

Segundo CORTEEL (1981), a porcentagem de espermatozóides 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).

JUSTIFICATIVA

Segundo estudos conduzidos por CORTEEL (1974; 1975), o plasma seminal interfere no tempo de conservação dos espermatozóides *in vitro*. Alguns experimentos relataram que a qualidade espermática do sêmen lavado, congelado e descongelado é significativamente superior a do sêmen não-lavado, com relação à motilidade individual progressiva (MIP), mas não no que se refere à percentagem de espermatozóides móveis (CORTEEL, 1975). Entretanto, as recomendações para lavagem espermática foram preconizadas após estudos realizados com animais de clima temperado, onde comprovadamente o plasma seminal exerce efeito deletério sobre os espermatozóides (NUNES, 1982).

NUNES (1982) demonstrou que esse efeito deletério do plasma seminal de estação não sexual provém das glândulas bulbouretrais que durante esta estação tornam-se hipertrofiadas e secretam grandes quantidades de fosfolipases do tipo A. Esta enzima age sobre os fosfolipídios dos diluidores, levando à formação de lisolecitinas e ácidos graxos, que exercem ação tóxica sobre os espermatozóides (ROY, 1957). Portanto, diluidores pobres em fosfolipídios poderiam ser a solução para evitar ou reduzir os efeitos negativos causados pela fosfolipase A sobre o sêmen de animais desta espécie (NUNES, 1987). Dentre as alternativas de diluidores pobres em fosfolipídios, surgiu a água de coco que, através de experimentos *in vitro* e *in vivo*, exibiu um excelente comportamento no que se refere ao vigor e motilidade de espermatozóides móveis e fertilidade (NUNES, 1986).

Na tentativa de solucionar este problema, o uso de sêmen resfriado e diluído em água de coco poderá ser uma alternativa para utilização do sêmen caprino, pois alguns estudos têm demonstrado que o mesmo pode permanecer viável para uso em inseminação artificial por até 48 h (CAMPOS et al., 2001b), aumentando assim, o campo de atuação e aplicação do sêmen resfriado em programas de inseminação artificial.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a influência *in vitro* e *in vivo* do diluidor água de coco com gema de ovo, adicionado ou não de glicerol, sobre o sêmen caprino resfriado a 4 ºC.

Objetivos Específicos

1. Avaliar *in vitro* se a adição de glicerol ao diluidor água de coco afeta a sobrevivência espermática (porcentagem de espermatozóides móveis e motilidade individual progressiva), após conservação a 4 ºC por até 48 horas;

2. Avaliar se a presença do glicerol no meio de conservação favorece a sobrevivência espermática a 4 ºC;

3. Verificar a porcentagem de alterações morfológicas dos espermatozóides, aos 120 minutos de incubação em banho-maria, após resfriamento por 0, 24 e 48 horas;

4. Avaliar a fertilidade do sêmen diluído em água de coco (adicionada de gema de ovo e glicerol) resfriado a 4 ºC, após 12 e 24 h de conservação, através da inseminação artificial de cabras.

EXPERIMENTOS REALIZADOS

Artigo 1

Viabilidade *In Vitro* do Sêmen Caprino Saanen Diluído em Água de Coco e Resfriado a 4 ºC

Artigo publicado na Revista Ciência Veterinária nos Trópicos v.5, n.1, p.31-38, jan/abr, 2003

VIABILIDADE *IN VITRO* DO SÊMEN CAPRINO SAANEN DILUÍDO EM ÁGUA DE COCO E RESFRIADO A 4 ºC

Emmanuelle Lima de FIGUEIRÊDO[1]; José Ferreira NUNES[2]; Ana Cláudia Nascimento CAMPOS[3]; Alexandre Weick Uchôa MONTEIRO[4] e Artur Henrique Soares da SILVA FILHO[4]

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi verificar *in vitro,* a viabilidade do sêmen caprino resfriado diluído em água de coco adicionada de gema de ovo e glicerol. Foram preparados tratamentos a partir do diluidor água de coco (AC): 1) AC + gema de ovo e 2) AC + gema de ovo + glicerol. Ejaculados de reprodutores Saanen foram diluídos e resfriados a 4ºC por até 48h. Amostras do sêmen resfriado, foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR) e avaliadas quanto à motilidade individual progressiva (MIP) e porcentagem de espermatozóides móveis (PEM). A taxa de degradação da motilidade (TDM) foi calculada ao final da incubação. Esfregaços de sêmen foram realizados para avaliação da morfologia espermática (ME). Os parâmetros de MIP, PEM, TDM e ME, nos diferentes tempos de conservação e diluidores, foram expressos em média e erro padrão (SEM) e submetidos a ANOVA (P<0,05). Resultados significativos superiores (P<0,05) foram encontrados no diluidor sem glicerol, para os parâmetros de MIP, PEM TDM e ME, dentro de cada período de resfriamento e tempo de incubação. Concluiu-se que a adição de glicerol não confere aos espermatozóides conservados por até 48h a 4ºC, ação de criopreservação, não interagindo positivamente para a integridade espermática como no sêmen congelado.

Termos para indexação: sêmen, caprino, resfriamento, diluidor.

[1]Méd. Veterinária, Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV-UECE). FAVET/UECE. Av. Paranjana s/n – Fortaleza - 60740-000 – CE – E-mail: lukafig@yahoo.com - * **Autor para Correspondência**
[2]Méd**.** Veterinário, Ph.D, Professor, Pesquisador, (PPGCV-UECE).
[3]Méd. Veterinária, Doutoranda, (PPGCV-UECE).
[4]Bolsistas de Iniciação Científica – CNPq, Curso de Medicina Veterinária, FAVET – UECE

VIABILITY *IN VITRO* OF BUCK SEMEN DILUTED IN COCONUT WATER AND COOLED TO 4ºC

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate *in vitro* the viability of buck semen cooled and diluted in coconut water added of egg yolk and glycerol. Treatments were prepared in extender containing coconut water (CW): 1) CW + egg yolk and 2) CW + egg yolk + glycerol. Ejaculated Saanen bucks were diluted and cooled to 4ºC for up to 48h. Samples of the cooled semen were submitted to thermoresistence test (TTR) and evaluated that the motility progressive individual (MPI) and porcentage of motile spermatozoa (PMS). The motility degradation rate (MDR) was calculated to the end of the incubation. Semen slides were accomplished for evaluation of sperm morphology (SM). The parameters PIM, PMS, MDR and SM, in the times differents of conservation and extenders were expressed on the average and standart error media (SEM) and submitted at ANOVA (P<0,05). Significatives results higher (P<0,05) were finded in the extender without glycerol for the parameters of PIM, PMS MDR and SM, inside each períod of the cooling and time of incubation. In conclusion the addition of glycerol do not confer to the spermatozoa conservated for up to 48h to 4ºC, advantage with relation to the parameters PIM and PMS.

Index terms: semen, goats, cooling, extender.

INTRODUÇÃO

Em busca de alternativas para melhorar a função produtiva e reprodutiva de animais domésticos de interesse econômico, como caprinos e ovinos, pesquisadores de todo o mundo têm procurado desenvolver biotécnicas como a sincronização do estro, a inseminação artificial (com utilização do sêmen fresco, resfriado ou

congelado) e a transferência de embriões, que permitam a eficiência máxima de animais de alto padrão genético (Nunes, 1999).

Uma das principais biotecnologias utilizadas é a inseminação artificial, considerada uma das mais valiosas práticas de manejo reprodutivo disponível aos criadores (Machado & Simplício, 1990).

Pequenos, médios e grandes produtores recorrem à inseminação artificial como técnica usual de manejo reprodutivo, buscando elevar a eficiência e otimizar o retorno econômico da atividade pecuária. Este método propaga os genes com maior rapidez, facilitando assim, uma avaliação eficiente de um indivíduo quando comparada com a monta natural (Scheid, 1997).

Muitos diluidores têm sido usados na congelação do sêmen caprino, porém o leite desnatado continua sendo o preferido, devido à sua disponibilidade (Hoffman, 1972, citado por Nunes & Salles, 1993). Entretanto, algumas dificuldades são encontradas na congelação do sêmen caprino, devido à interação do plasma seminal com os fosfolipídios existentes nos diluidores convencionais, tal como o leite desnatado (Nunes, 1986).

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 motilidade de espermatozóides móveis e fertilidade (Nunes, 1986).

A tecnologia de beneficiamento do sêmen diluído em água de coco, poderá contribuir de maneira significativa para a conservação e multiplicação de animais geneticamente superiores, bem como aqueles em via de extinção, tornando-se necessários estudos sobre a viabilidade do sêmen caprino, diluído em água de coco e resfriado a 4 ºC. O prolongamento da sobrevivência das células espermáticas,

permitirá desta forma, seu emprego em longas distâncias, prorrogando assim o tempo de uso e com chances de obterem-se melhores índices de fertilidade.

Neste trabalho objetivou-se verificar *in vitro* a influência do diluidor água de coco, adicionado de gema de ovo e glicerol, sobre o sêmen caprino resfriado a 4 ºC.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento *in vitro* utilizando o sêmen caprino diluído em água de coco acrescida de gema de ovo e glicerol 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 3º45'47" de latitude sul e 38º30'37" de longitude oeste.

Foram utilizados quatro machos caprinos da raça Saanen submetidos a manejo intensivo de criação. Os animais foram coletados uma vez por semana, por meio de vagina artificial, durante 6 semanas, perfazendo um total de 24 ejaculados.

Dois tratamentos foram preparados a partir do diluidor água de coco (50% de água de coco, 25% de água destilada e 25% de citrato de sódio a 5%), conforme protocolo a seguir:

(1) Diluidor água de coco + 3,0 % de gema de ovo (testemunho);

(2) Diluidor água de coco + 3,0 % de gema de ovo + 7% de glicerol.

Após a coleta, o sêmen de cada reprodutor foi avaliado quanto ao volume (ml), motilidade massal (escore de 0-5) e concentração espermática ($x10^9$ sptz/ml). Em seguida, o sêmen foi dividido em duas alíquotas, diluído (diluidores 1 e 2) a uma concentração final de 200 x 10^6 sptz/ml e resfriado a 4ºC. Amostras do sêmen resfriado foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR) em banho-maria a

37 ºC e avaliadas quanto à motilidade individual progressiva (MIP) e porcentagem de espermatozóides móveis (PEM) aos 5, 60 e 120 minutos de incubação. Estas avaliações foram realizadas às 0, 24 e 48 h de resfriamento. A taxa de degradação da motilidade (TDM) foi calculada ao final de cada TTR e tempo de resfriamento, pela seguinte fórmula:

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

Esfregaços de sêmen foram realizados aos 120 min de incubação para análise da porcentagem de alterações morfológicas, corados com eosina 1%, nigrosina 3% e citrato de sódio 3%. Foram observadas 200 células por lâmina conforme metodologia de Colas (1980).

Os parâmetros de MIP, PEM, TDM e morfologia espermática, nos diferentes tempos de conservação (0, 24 e 48h) e diluidores, foram expressos em média e erro padrão (SEM) e submetidos a ANOVA ($P<0,05$). Os percentuais relativos à avaliação da PEM e TDM foram transformados pela fórmula arco seno $\sqrt{\%}$ para normalização dos dados. Quando foi identificada diferença entre os tratamentos, os parâmetros foram submetidos ao teste Fisher's PLSD a 5% (Stat View, 5.0). Os ejaculados foram considerados repetições para cada tempo de conservação e diluidor testado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 1, 2 e 3 e as figuras 1, 2, 3 e 4 mostram os resultados obtidos com o sêmen caprino submetido ao teste de termorresistência em banho-maria a 37ºC com avaliações aos 5, 60 e 120 minutos de incubação, após 0, 24 e 48h de

resfriamento. Houve diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos testados, nos parâmetros MIP, PEM TDM e morfologia espermática, dentro de cada período de resfriamento e tempo de incubação.

Os resultados da MIP (Figuras 1 e 2) demonstraram que a partir dos 5 min de incubação a 37 ºC, já era possível verificar-se diferença significativa no sêmen sem glicerol (S/G) e no sêmen com glicerol (C/G) conservados entre 0h e 48h a 4 ºC (P<0,05), quando comparados os tempos de resfriamento (P<0,05). Aos 60 min do TTR, foi observado o mesmo comportamento no sêmen S/G, enquanto que no sêmen C/G, observou-se diferença significativa somente entre 0h e 24h de incubação (P<0,05). Entretanto, em todos os tempos de conservação, após 120 min do TTR, não foi verificada diferença significativa (P>0,05). Foram observadas diferenças significativas aos 5 min de incubação no TTR (Tabela 1), entre os dois tratamentos dentro de cada tempo de resfriamento (0, 24 e 48h), já aos 60 min e 120 min de incubação, foi observada diferença significativa somente entre as amostras conservadas por 0h e 24h, onde observou-se uma melhor motilidade para o sêmen S/G. Quanto à TDM, não foi constatada diferença significativa entre os tempos de conservação e nem entre os tratamentos estudados (P>0,05).

No tocante à PEM (Figuras 4 e 5), constatou-se que a partir dos 5 min de incubação, houve diferença significativa no sêmen sem glicerol (S/G) e no sêmen com glicerol (C/G) conservados entre 0h e 48h a 4 ºC (P<0,05), quando comparados os tempos de resfriamento (P<0,05). Aos 60 min do TTR, foi observado o mesmo comportamento nos dois tratamentos. Entretanto, em todos os tempos de conservação, após 120 min do TTR, não foi verificada diferença significativa (P>0,05). Quando comparados os dois tratamentos (Tabela 2), dentro de cada período de resfriamento (0, 24 e 48h), verificou-se diferença significativa (P<0,05)

aos 5 min. Aos 60 min, somente o sêmen resfriado por 0h apresentou diferença significativa, já aos 120 min pôde-se observar diferença significativa entre as amostras resfriadas por 0h e 24h. O sêmen S/G mostrou-se superior ao sêmen C/G.

Referente à morfologia espermática (Tabela 3), não foi observada diferença significativa nas amostras testadas, quando comparados os três tempos de resfriamento. Diferenças significativas ($P<0,05$) foram detectadas para os parâmetros células normais, defeitos de flagelo e patologias totais entre as amostras testadas, dentro de cada período de conservação, não sendo no entanto, observada diferença significativa no parâmetro defeitos de cabeça. O sêmen S/G apresentou maior porcentagem de células normais quando comparado com o sêmen C/G.

Os resultados *in vitro* apresentados neste trabalho, confirmaram a boa característica conservadora da água de coco acrescida de 3% de gema de ovo, quando utilizada como diluidor para o resfriamento de sêmen caprino, também obtidos por Campos et al. (2001) utilizando 2,5% de gema de ovo.

Roca et al. (1997), observaram um declínio na motilidade espermática de acordo com o tempo de conservação do sêmen caprino estocado a 5 ºC em Tris com 2% de gema de ovo. Neste estudo observou-se uma diminuição gradativa nos parâmetros MIP e PEM, quando comparados os três períodos de resfriamento.

Bedford et al. (1995) ao testarem quatro tratamentos à base de leite desnatado-glicose (LDG): 1) LDG, 2) LDG + 4% de gema de ovo (GO), 3) LDG + 4% de glicerol (GL) e 4) LDG + 4% de gema de ovo + 4% de glicerol (GO + GL), verificaram que nas 24h de resfriamento a 5ºC, a MIP e PEM foram inferiores no sêmen equino diluído em LDG+GO do que nos demais tratamentos. Já às 48h, estes mesmos parâmetros foram inferiores nos diluidores contendo gema de ovo do que nos diluidores sem gema. Estes resultados foram contrários aos observados neste

experimento utilizando água de coco como diluidor do sêmen caprino, pois a gema de ovo, rica em fosfolipídeos, pode ter fornecido ao diluidor água de coco, uma maior proteção à membrana dos espermatozóides.

Os estudos realizados por Nunes & Silva (1984) demonstraram que a MIP decresceu de 3,5 para 3,0 e a PEM de 70% para 55% nas primeiras 6h do resfriamento, no sêmen diluído em leite desnatado. Estes resultados foram superiores aos encontrados por Campos et al. (2001), que utilizaram água de coco adicionada de 2,5% de gema de ovo, porém foram inferiores aos observados neste trabalho com o sêmen diluído em água de coco sem glicerol. Esta diferença pode ser atribuída possivelmente, à qualidade dos ejaculados utilizados nos diferentes experimentos.

Quanto à TDM, Campos et al. (2001) não observaram diferença significativa entre os tempos de conservação estudados (0, 24, 48 e 72 horas), o que também foi constatado neste estudo. Já Toniolli (1989), ao estudar o comportamento do sêmen caprino diluído em água de coco *in natura*, estabilizada e em gel, verificou que os valores médios da TDM foram de 40,30% para a água de coco *in natura*, 72,02% para a estabilizada e 81,08% para gel.

Shore et al. (1998) demonstraram que a PEM no sêmen equino resfriado por 24h foi maior do que no sêmen resfriado por 48h e Azevêdo & Toniolli (2000) observaram o mesmo comportamento no sêmen caprino diluído em leite desnatado acrescido de ácido 3-indol acético (IAA), que apresentou valores de 2,1 e 48% para os parâmetros MIP e PEM, respectivamente, após 48h de resfriamento. Este experimento mostrou valores aproximados aos obtidos por Azevêdo & Toniolli (2000), tanto para o sêmen S/G quanto para o sêmen C/G.

Como o valor mínimo para MIP considerado para utilização do sêmen é de 3,0 (Corteel, 1981; Fonseca et al., 1992), o diluidor S/G poderia ser utilizado nos três tempos de resfriamento, enquanto que o diluidor C/G, deveria ser utilizado somente no primeiro tempo. Considerando-se no entanto, que o valor mínimo para a PEM deve ser de 30% para permitir taxas de fecundação aceitáveis (Corteel, 1981; Fonseca et al., 1992), os dois tratamentos poderiam ser utilizados 48h após o resfriamento.

No tocante à morfologia espermática, observou-se que as patologias totais (%) no sêmen S/G não ultrapassaram o limite máximo de utilização do sêmen caprino, que é de 15% (Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, 1998), apresentando valores bem inferiores aos encontrados no sêmen C/G, obtidos neste estudo. Estes resultados diferiram dos encontrados por Araújo & Nunes (1991), que obtiveram uma porcentagem de 7,9% de alterações morfológicas no sêmen caprino diluído em água de coco acrescida de gema de ovo e 14% de glicerol contra 16,4% de alterações, na água de coco com 18% de glicerol.

CONCLUSÃO

Ao contrário do que se observa sobre a ação crioprotetora do glicerol adicionado ao sêmen congelado a -196 ºC, sua adição ao sêmen resfriado a 4ºC, não desempenha função fisiológica importante, já que na avaliação *in vitro*, os valores de motilidade individual progressiva e porcentagem de espermatozóides móveis, sempre foram inferiores no sêmen contendo glicerol, mesmo nos tempos de conservação mais prolongados.

Testes de fertilidade *in vivo*, deverão ser realizados para recomendação final do método.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco *in natura* com adição de gema de ovo como diluente de congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.1, n.1, p.39-49, 1991.

AZEVÊDO, D.M.M.R.; TONIOLLI, R. Avaliação *in vitro* do sêmen de caprinos do tipo racial Marota diluído em água de coco estabilizada com antibióticos e leite desnatado adicionado de ácido 3-indol-acético (IAA). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.24, n.4, p.187-193, 2000.

BEDFORD, S.J.; GRAHAM, J.K.; AMANN, R.P. Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5 ºC with and without seminal plasma. **Theriogenology***,* New York, v.43, p.939-953, 1995.

CAMPOS, A.C.N.; FERREIRA, M.A.L.; PINHEIRO, J.H.T.; et al. Resfriamento a 4 ºC do sêmen caprino diluído em água de coco. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n.3, p.430-431, 2001.

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.

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

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; ABREU, J.J. et al. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992.

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

MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DE SÊMEN ANIMAL. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.

NUNES, J.F.; SILVA, A.E.D.F. Tecnologia do sêmen resfriado em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.8, n. 2, p. 121-127, 1984.

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.; SALLES, F.G.M. El agua de coco (*Cocus nucifera L.*) *in natura* integral y adicionada com citoquininas, como dilutor de semen caprino. **Revista Científica,** Luz**,** v.3, p.273-281, 1993.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica Produção Animal,** Fortaleza, v.1, n.1, p.17-26, 1999.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J.A.; CAMPOS, I.; et al. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5 ºC. **Small Ruminant Research,** New York, v.25, p.147-153, 1997.

SCHEID, I.R. O papel da inseminação artificial na produção de suínos. In: II SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, Fortaleza, Ciência Animal, v.7, n.2, jul/dez 1997.

SHORE, M.D., MACPHERSON, M.L., COMBES, G.B., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. **Theriogenology**, New York, v.50, p.693-698, 1998.

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

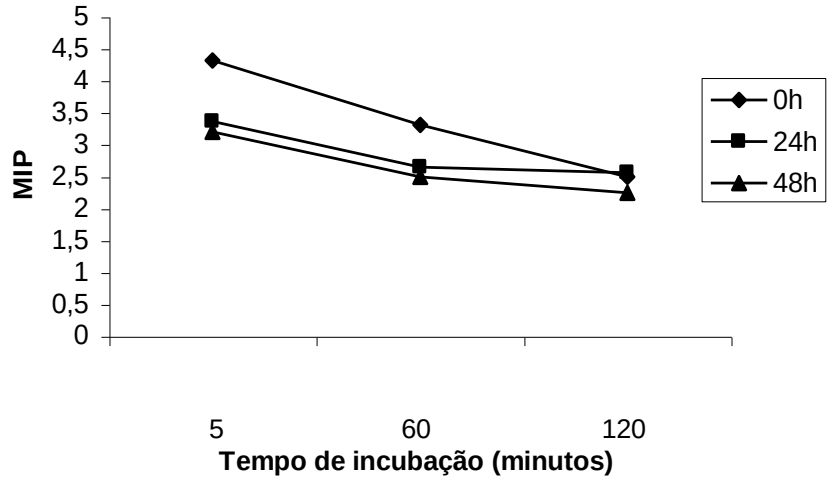


Figura 1- Motilidade individual progressiva (MIP) do sêmen caprino sem glicerol, nos tempos de resfriamento 0, 24 e 48 h, de acordo com o tempo de incubação.

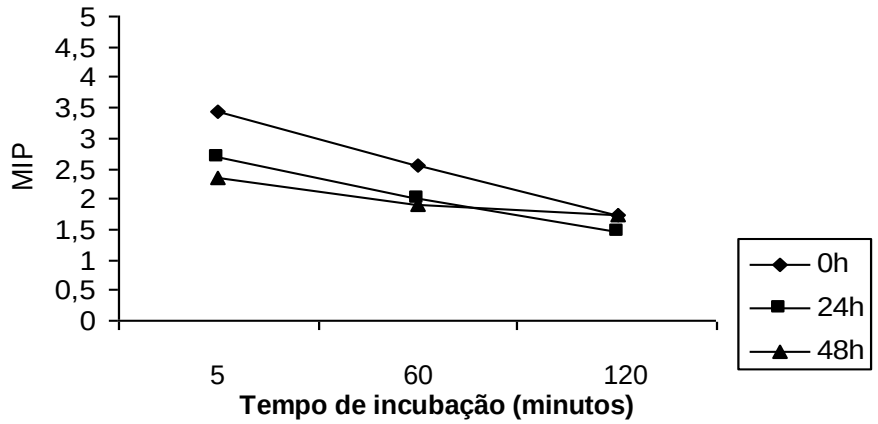


Figura 2- Motilidade individual progressiva (MIP) do sêmen caprino com glicerol, nos tempos de resfriamento 0, 24 e 48 h, de acordo com o tempo de incubação.

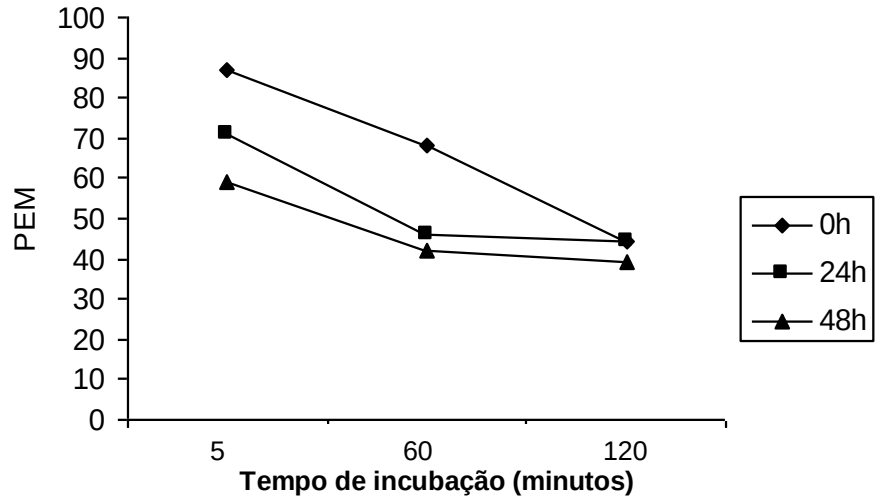


Figura 3- Porcentagem de espermatozóides móveis (PEM) do sêmen caprino sem glicerol, nos tempos de resfriamento 0, 24 e 48 h, de acordo com o tempo de incubação.

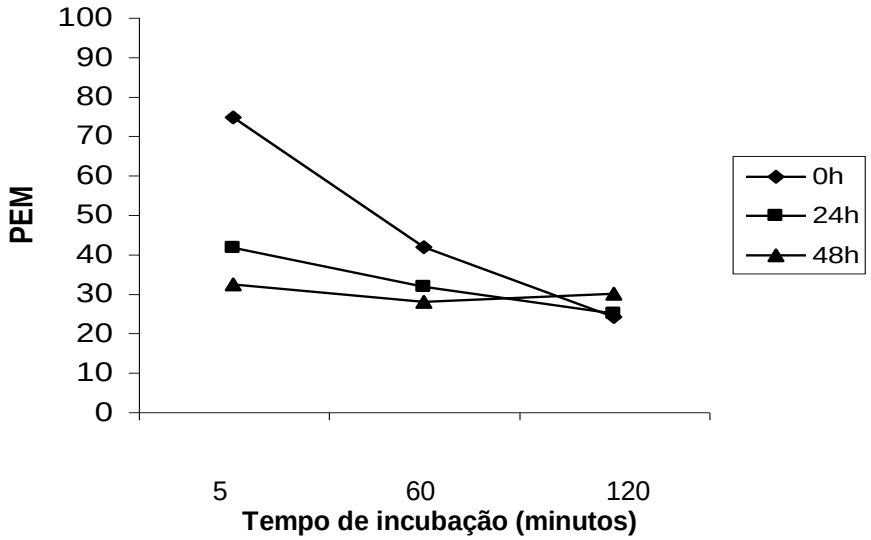


Figura 4- Porcentagem de espermatozóides móveis (PEM) do sêmen caprino com glicerol, nos tempos de resfriamento 0, 24 e 48 h, de acordo com o tempo de incubação.

Tabela 1: Motilidade Individual Progressiva (MIP) do sêmen caprino diluído em água de coco sem glicerol (S/G) e com glicerol (C/G), resfriado por até 48h a 4ºC e submetido ao Teste de Termorresistência (TTR).

Tempo de resfriamento	Tratamento	TTR			TDM (%)
		5 min	60 min	120 min	
0 h	S/G	$4,32 \pm 0,05^{aA}$	$3,31 \pm 0,14^{aB}$	$2,50 \pm 0,21^{aC}$	$62,98 \pm 6,45$
	C/G	$3,45 \pm 0,11^{b1}$	$2,56 \pm 0,13^{b2}$	$1,73 \pm 0,18^{b3}$	$67,55 \pm 6,07$
24h	S/G	$3,36 \pm 0,11^{aA}$	$2,65 \pm 0,21^{aB}$	$2,56 \pm 0,33^{aBC}$	$72,66 \pm 7,63$
	C/G	$2,69 \pm 0,14^{b1}$	$2,00 \pm 0,21^{b2}$	$1,45 \pm 0,24^{b2,3}$	$72,71 \pm 6,95$
48h	S/G	$3,21 \pm 0,25^{a}$	$2,50 \pm 0,35$	$2,25 \pm 0,55$	$70,27 \pm 10,25$
	C/G	$2,35 \pm 0,22^{b}$	$1,92 \pm 0,29$	$1,75 \pm 0,75$	$88,78 \pm 8,07$

^{ab} letras diferentes, comparação entre linhas, sêmen S/G e C/G (P<0,05).
^{ABC} letras diferentes, comparação entre colunas, S/G (5, 60 e 120 min) (P<0,05).
^{1,2,3} nº diferentes, comparação entre colunas, C/G (5, 60 e 120 min) (P<0,05).

Tabela 2: Porcentagem de Espermatozóides Móveis (PEM) do sêmen caprino diluído em água de coco sem glicerol (S/G) e com glicerol (C/G), resfriado por até 48h a 4ºC e submetido ao Teste de Termorresistência (TTR).

Tempo de resfriamento	Tratamento	TTR		
		5 min	60 min	120 min
0 h	S/G	$87,20 \pm 1,50^{aA}$	$68,12 \pm 4,57^{aB}$	$44,06 \pm 6,04^{aC}$
	C/G	$74,59 \pm 2,79^{b1}$	$41,81 \pm 3,31^{b2}$	$24,00 \pm 3,13^{b2,3}$
24h	S/G	$70,80 \pm 3,65^{aA}$	$45,78 \pm 5,96^{B}$	$44,37 \pm 8,47^{aBC}$
	C/G	$41,66 \pm 3,73^{b1}$	$31,66 \pm 3,73^{1,2}$	$25,00 \pm 3,94^{b2}$
48h	S/G	$59,33 \pm 6,56^{a}$	$42,27 \pm 7,21$	$39,16 \pm 11,13$
	C/G	$32,27 \pm 4,89^{b}$	$27,85 \pm 5,10$	$30,00 \pm 10,00$

^{ab} letras diferentes, comparação entre linhas, sêmen S/G e C/G (P<0,05).
^{ABC} letras diferentes, comparação entre colunas, S/G (5, 60 e 120 min) (P<0,05).
^{1,2,3} nº diferentes, comparação entre colunas, C/G (5, 60 e 120 min) (P<0,05).

Tabela 3: Morfologia espermática do sêmen caprino diluído em água de coco sem glicerol (S/G) e com glicerol (C/G), resfriado por até 48h a 4ºC e submetido por até 120 min de incubação.

Tempo resfriamento	Tratamento	Células Normais	Defeitos de flagelo	Defeitos de cabeça	Patologias totais
0 h	S/G	189,50± 2,10[a]	5,37± 1,63[b]	4,93± 1,22	10,50± 2,10[b]
	C/G	163,80± 6,79[b]	33,53± 7,02[a]	2,33± 0,72	36,13± 6,76[a]
24h	S/G	193,66± 2,01[a]	3,11± 1,28[b]	3,00± 1,15	6,11± 1,90[b]
	C/G	159,80± 7,54[b]	35,70± 7,37[a]	4,30± 1,09	40,20± 7,54[a]
48h	S/G	189,16± 5,18[a]	5,33± 2,47[b]	5,50± 3,20	10,83± 5,18[b]
	C/G	159,00± 9,00[b]	39,50± 10,50[a]	1,50± 1,50	41,00± 9,00[a]

[ab] letras diferentes, comparação entre linhas, sêmen S/G e C/G.

Artigo 2

Fertilidade de Cabras Inseminadas Artificialmente com Sêmen Refrigerado a 4 ºC e Conservado por até 24 Horas

Artigo publicado na Revista Brasileira de Reprodução Animal, supl., n. 5, p.118-120, out., 2002.

Fertilidade de cabras inseminadas artificialmente com sêmen refrigerado a 4ºC e conservado por até 24 horas

(Fertility of goats artificially inseminated with cooled semen to 4ºC and conservated for until 24 hours)

Figueirêdo, E.L.[1]; Nunes, J.F.[1]; Monteiro, A.W.U.[1]; Pinheiro, J.H.T.[1]; Campos, A.C.N.[2]; Santos, R.R.[1]; Medeiros, C.H.N.[3]

[1]Universidade Estadual do Ceará, [2]Universidade Vale do Acaraú, [3]GP- Genética e Produção de Caprinos e Ovinos
E-mail: lukafig@yahoo.com

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi verificar a influência do diluidor à base de água de coco adicionado de gema de ovo e glicerol e resfriado por até 24h a 4 ºC, sobre a fertilidade de cabras inseminadas artificialmente. Cabras tiveram o estro sincronizado, através de esponjas intra-vaginais, impregnadas com acetato de medroxi-progesterona (MAP), que permaneceram por 11 dias na porção cranial da vagina. No nono dia do tratamento hormonal, foram aplicadas por via intra-muscular gonadotrofina corônica equina (eCG) e prostaglandina. Os ejaculados obtidos de reprodutores foram diluídos em solução à base de água de coco acrescida de 7% de glicerol e 3% de gema de ovo, resfriados a 4 ºC por 12h e 24 h. Inseminaram-se 155 fêmeas com sêmen resfriado por 12h (lote experimental A) e 200 com sêmen resfriado por 24h (lote experimental B). Os resultados do parâmetro prenhez, observados por ultrassonografia, foram analisados através do teste do Qui-quadrado, com nível de significância de 5% de probabilidade. Houve diferença significativa ($P<0,05$) entre as taxas de fertilidade de 41,29% (60/155) e de 54% (108/200) obtidas após inseminação artificial com sêmen resfriado por 12 e 24 horas, respectivamente. Concluiu-se que a adição de glicerol e gema de ovo ao diluidor à base de água de coco pode contribuir para a manutenção não apenas da viabilidade, mas também da fertilidade do sêmen caprino submetido a resfriamento.

PALAVRAS-CHAVE: fertilidade, caprino, resfriamento.

SUMMARY

The aim of the present study was to check the influence of the coconut water based extender added of egg yolk and glycerol, cooled for until 24h to 4 ºC on the fertility of goats artificially inseminated. Goats had the estro syncronized through vaginal sponges, impregnated with medroxiprogesterone acetate (MPA) which stayed for 11 days in the cranial portion of the vagina. In the ninth day of the hormonal treatment were aplicatted intramuscular injections with equine corionic gonadotrophine (eCG) and prostaglandin. The ejaculates obtained of bucks were diluted in solution coconut water based added of 7% glycerol and 3% egg yolk, cooled to 4 ºC for 12h and 24h. The 155 females were inseminated with cooled semen for 12h (experimental batch A) and 200 with cooled semen for 24h (experimental batch B). The results of the pregancy parameter, observed by ultrasonography were analysed through Chi-

square analysis with significance level of 5%. There were significative differences (P<0,05) between the rates of fertility of 41,29% (60/155) and 54% (108/200) obtained after articial insemination with cooled semen for 12 and 24 h respectively. In conclusion, the addition of glycerol and egg yolk to the coconut water based extender can contribute to the maintenance not only of the viability, but also of the fertility of the buck semen submitted to the cooling.

KEY WORDS: fertility, goat, cooling.

INTRODUÇÃO

A técnica de IA, usando sêmen congelado ou resfriado, tem proporcionado em muitos países, um incremento significativo no melhoramento de seus rebanhos (Colas, 1984). Este método propaga os genes com maior rapidez, facilitando assim, uma avaliação eficiente de um indivíduo quando comparada com a monta natural (Sheid, 1997).

A água de coco tem sido muito utilizada em biotecnologias relacionadas à reprodução animal. Excelentes resultados foram obtidos com a utilização da água de coco em estudos de preservação de sêmen de animais domésticos como caprinos (Freitas, 1988; Salles, 1989; Rodrigues et al., 1994; Nunes, 1998), ovinos (Freitas, 1992; Cruz, 1994; Sousa et al., 1994), suínos (Toniolli, 1989; Toniolli & Mesquita, 1990) e caninos (Montezuma Jr. et al., 1994).

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. (2001a) 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.

O uso de sêmen resfriado e diluído em água de coco poderá ser uma alternativa para utilização do sêmen caprino, pois alguns estudos têm demonstrado que o mesmo pode permanecer viável para uso em inseminação artificial por até 48 h (Campos et al., 2001b), aumentando assim, o campo de atuação e aplicação do sêmen resfriado.

Este trabalho teve por objetivo verificar *in vivo* a influência do diluidor água de coco, adicionado de gema de ovo e glicerol, sobre o sêmen caprino resfriado a 4 ºC.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em propriedades particulares e na sede da GP-Caprinos e Ovinos, situados no município de Quixadá-CE, que está situado em uma planície litorânea a 4º58’ de latitude sul e 39º02’ de longitude oeste. Foram utilizadas 355 cabras do tipo SRD, com idade média de três anos submetidas a manejo semi-extensivo de criação. As fêmeas tiveram o seu estro sincronizado através de esponjas intra-vaginais, impregnadas com 50 mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP), que permaneceram por 11 dias na porção cranial da vagina. No nono dia do tratamento hormonal, foram aplicadas por via intra-muscular 200 UI de gonadotrofina corônica equina (eCG) e 50 μg de prostaglandina. Os ejaculados foram obtidos de reprodutores com idade média de dois anos, por meio de vagina artificial. Após a coleta, o sêmen foi diluído em uma solução à base de água de coco (50% de água de coco, 25% de água destilada e 25% de citrato de sódio a 5%),

acrescida de 7% de glicerol e 3% de gema de ovo e resfriado a 4ºC em geladeira, por 12h e 24 h.

As cabras foram distribuídas em dois lotes experimentais: 155 fêmeas foram inseminadas com sêmen resfriado por 12h (lote experimental A) e 200 com sêmen resfriado por 24h (lote experimental B). As inseminações foram realizadas entre 36 e 40 h após a retirada das esponjas, utilizando-se palhetas de 0,5 mL, contendo uma concentração de 200 x 10^6 sptz/dose.

O diagnóstico de gestação foi obtido 35 dias após as inseminações, utilizando-se um aparelho de ultrasom pie medical com sonda linear via transretal.

Os resultados do parâmetro prenhez, observados por ultrassonografia, foram analisados através do teste do Qui-quadrado, estimando-se a média e desvio padrão para cada lote e comparando-se entre os tratamentos com nível de significância de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa (P<0,05) entre as taxas de fertilidade de 41,29% (60/155) e de 54% (108/200) obtidas após inseminação artificial com sêmen resfriado por 12 e 24 horas, respectivamente.

Apesar de superiores às taxas de fertilidade obtidas no estudo, Roca et al. (1997), ao avaliarem a fertilidade do espermatozóide caprino lavado (70,3%) e não-lavado (73,5%), resfriado a 5ºC por 6-36 horas, não observaram diferença significativa entre os resultados (P<0,05), semelhante ao verificado por Jobim et al. (1987), ao inseminarem ovelhas com sêmen diluído em INRA acrescido de 20% de gema de ovo e resfriado a 5 ºC por 7-8 horas (45%) e com sêmen puro (60%). Já Nunes (1997) verificou que a fertilidade de cabras inseminadas com sêmen diluído em água de coco (88%) foi superior à fertilidade obtida com sêmen diluído em leite (85%).

Durante três anos de estudo foram obtidas taxas de fertilidade de cabras do tipo SRD, Saanen e Marota de 82%, 87% e 85%, para o 1º, 2º e 3º ano, respectivamente, utilizando-se sêmen resfriado a 4 ºC por 6-12 horas (Nunes & Salgueiro, 1996; Nunes, 1997; Nunes, 1998), período mínimo de conservação utilizado neste experimento.

Shore et al. (1998) observaram uma taxa de prenhez de 67% para os dois grupos de fêmeas inseminadas com sêmen equino resfriado a 6 ºC por 24h (dose única) e por 48h (metade da dose no primeiro dia e a outra metade no dia seguinte), enquanto que Squires et al. (1998), ao inseminarem éguas com sêmen resfriado a 5 ºC por 24h, utilizando o dobro da dose recomendada (2 x 10^9 sptz), com uma única dose (1 x 10^9 sptz) ou com duas doses de 1 x 10^9 sptz cada por dois dias consecutivos, obtiveram taxas de prenhez de 41%, 31% e 64%, respectivamente. No presente estudo, inseminaram-se cabras com uma única dose contendo 200 x 10^6 de espermatozóides (sptz).

Bedford et al. (1995) ao pesquisarem se a gema de ovo ou o glicerol afetavam a fertilidade de fêmeas inseminadas com sêmen equino diluído em solução à base de leite desnatado-glicose (LDG), acrescida de gema de ovo (LDG + GO) ou glicerol (LDG + G), e resfriado a 5 ºC por 24h, verificaram que a gema de ovo ou o glicerol adicionado ao diluidor LDG, afetou a fertilidade, ao contrário do que foi observado neste estudo, com sêmen caprino diluído em solução à base de água de coco, também acrescida de gema de ovo e glicerol.

CONCLUSÃO

Embora sendo conservado por um período mais longo, o sêmen resfriado por 24 horas apresentou uma taxa de fertilidade significativamente superior à do sêmen conservado por 12 horas, o que demonstra que a adição de glicerol e gema de ovo ao diluidor à base de água de coco pode contribuir para a manutenção não apenas da viabilidade, mas também da fertilidade do sêmen caprino submetido ao resfriamento a 4 ºC, garantido desta forma, bons resultados nos trabalhos com inseminação artificial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDFORD, S.J., JASKO, D.J. GRAHAM. J.K., AMANN, R.P. SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.43, p.955-967, 1995.

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***,* v.11, supl.2, p.105-108, 2001a.

CAMPOS, A.C.N.; FERREIRA, M.A.L.; PINHEIRO, J.H.T.; MONTEIRO, A.W.U.; NUNES, J.F. Resfriamento a + 4 ºC do sêmen caprino diluído em água de coco. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, n.3, p.430-431, 2001b.

COLAS, G*.* Sêmen technology in the ram. In: THE MALE IN FARM ANIMAL REPRODUCTION, COLLOQUE CEE, 1984 Nouzilly. *Anais*...Nouzilly, p.219-236. 1984.

CRUZ, J.F. DA. *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*. Fortaleza: UECE, 1994. 40p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

FREITAS, V.J.F. *Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina coriônica (hCG) inseminadas artificialmente*. Fortaleza: UECE, 1988. Monografia (Especialização em Medicina Veterinária).

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*. Fortaleza: UECE, 1992. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R., MIES FILHO, A., VIEIRA, J.M.S. Inseminação artificial em ovinos com sêmen refrigerado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.11, n.4, p.163-167, 1987.

MONTEZUMA, Jr., P.A., VIANA NETO, R.; 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. 4. 1987. Brasília, p.1305.

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

NUNES, J.F.; CIRÍACO, A.L.T.; SUASSUNA, U. *Produção e reprodução de caprinos e ovinos*. Fortaleza, LCR, 199p. 1997.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.22, n.2, p.109-112. 1998.

NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. **Rev. Cient. Prod. Animal**, v.1, n.1, p.17-26, 1999.

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 ºC. **Small Rum. Res.** v.25, p.147-153, 1997.

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

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

SCHEID, I.R. O papel da inseminação artificial na produção de suínos. *In:* II Simpósio Nacional de Biotecnologia da Reprodução de Animais Domésticos, Fortaleza, **Ciência Animal**, v.7, n.2, jul/dez 1997. Anexos.

SHORE, M.D., MACPHERSON, M.L., COMBES, G.B., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. **Theriogenology**, v.50, p.693-698, 1998.

SOUSA, N.M., TEIXEIRA, M.D.A.; OLIVEIRA, L.F. Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidores do sêmen ovino. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Olinda. *Anais*..., p. 583. 1994.

SQUIRES, E.L., BRUBAKER, J.K., MCCUE PICKEETT, B.W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. **Theriogenology**, v.49, p.743-749, 1998.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com B.T.S. **Rev. Bras. Reprod. Anim.***,* v.14, p.249-254. 1990.

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

CONCLUSÕES GERAIS

- Ao contrário do que se observa sobre a ação crioprotetora do glicerol adicionado ao sêmen congelado a -196 ºC, sua adição ao sêmen resfriado a 4ºC, não desempenha função fisiológica importante, já que na avaliação *in vitro*, os valores de motilidade individual progressiva e porcentagem de espermatozóides móveis, sempre foram inferiores no sêmen contendo glicerol, mesmo nos tempos de conservação mais prolongados.

- A adição de glicerol e gema de ovo ao diluidor à base de água de coco pode contribuir para a manutenção da fertilidade do sêmen caprino submetido ao resfriamento entre 5 a 0ºC, garantido desta forma, bons resultados nos trabalhos com inseminação artificial a campo. Porém, novos testes de fertilidade deverão ser realizados para recomendação final do método.

PERSPECTIVAS

A utilização de crioprotetores para células espermáticas, destacando-se o glicerol em temperaturas abaixo de 0 ºC, também possibilita uma segurança nos processos de refrigeração. Nos trabalhos a campo ou em condições nas quais as temperaturas de 4 a 5 ºC não possam ser rigorosamente controladas, a margem de perda celular devido ao resfriamento é amenizada com a adição de glicerol, permitindo uma melhor integridade das membranas espermáticas.

REFERÊNCIAS GERAIS

ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco *in natura* com adição de gema de ovo como diluente de congelação do sêmen caprino. *Ciência Animal*, Fortaleza, v.1, n.1, p.39-49, 1991.

AZEVÊDO, D.M.M.R.; TONIOLLI, R. Avaliação *in vitro* do sêmen de caprinos do tipo racial Marota diluído em água de coco estabilizada com antibióticos e leite desnatado adicionado de ácido 3-indol-acético (IAA). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.24, n.4, p.187-193, 2000.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, 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.

BEDFORD, S.J.; GRAHAM, J.K.; AMANN, R.P. Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5 ºC with and without seminal plasma. *Theriogenology,* v.43, p. 939-953. 1995.

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. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 1999.

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, 2001a.

CAMPOS, A.C.N.; FERREIRA, M.A.L.; PINHEIRO, J.H.T.; et al. Resfriamento a 4 ºC do sêmen caprino diluído em água de coco. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 25, n.3, p.430-431, 2001b.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Congelação do sêmen canino com um diluidor a base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. *Ciência Animal*, Fortaleza, v. 10 nº 1, p. 29-36, 2000.

CARNEIRO, G.F. Transporte e criopreservação de sêmen eqüino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, supl., n. 5, p. 37-41, 2002.

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

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. *Reprod. Nutri. Develop.* v.20, n. 6, p. 1789-1799, 1980.

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

CORTEEL, J. M. Viabilité des spermatozoides de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal: Effet du glucose. *Ann. Biol. Bioch. Biophys.* v.14, n.4B, p.741-745. 1974.

CORTEEL, J. M. Effet du lavage sur la conservation des spermatozoides le bouc, a basse temperature. *Elevage et Insemination.* v.146, p.26-30, 1975.

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

CORTELL, 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. DA. *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. *Anim. Reprod. Sci.,* v. 28, p. 87-94, 1992.

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

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; ABREU, J.J. et al. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992.

FREITAS, V.J.F. *Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina coriônica (hCG) inseminadas artificialmente.* 1998. 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.

HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal. 6 ed. Manole, 1995, 582p.

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

JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R., MIES FILHO, A., VIEIRA, J.M.S. Inseminação artificial em ovinos com sêmen refrigerado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 11, n. 4, p. 163-167, 1987.

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. *Anim. Reprod. Sci*. v. 62, p. 113-141, 2000.

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

MACHADO, R. SIMPLÍCIO, A.A. Manual do inseminador de caprinos e ovinos. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1999.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estádio atual. *Rev. Bras. Repr. Animal.* v. 19, p. 61-72, 1995.

MAIA, M.S. Avaliação andrológica em carneiros. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, supl., n. 5, p. 33-34, 2002.

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

MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DE SÊMEN ANIMAL. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.

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

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. *Reprod. Fert. Dev.* v. 5, p. 613-638, 1993.

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

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais. Porto Alegre, Sulina. 1987.

MONTEZUMA, Jr., P.A., VIANA NETO, R.; 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.

MONTEZUMA, Jr., P.A., VIANA NETO, R.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco *in natura* com adição de gema de ovo como diluente de congelação do sêmen

canino, em paillets de 0,5ml. In: XXIII CONGR. BRAS. MED. VET., Olinda. *Anais*...Olinda, 1994, p. 535.

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 espermatozöides de bouc*. 1982. Thèse de doctorat, 3e cycle, Paris VI. 1982.

NUNES, J.F.; SILVA, A.E.D.F. Tecnologia do sêmen resfriado em caprinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 8, n. 2, p. 121-127, 1984.

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. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v. 12, p. 85-91, 1988.

NUNES, J.F.; SALLES, F.G.M. El agua de coco (*Cocus nucifera L*.) *in natura* integral y adicionada con citoquininas, como dilutor de semen caprino. *Rev. Cient.* v. 3, p. 273-281, 1993.

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

NUNES, J.F. & COMBARNOUS, Y., PRYSCILA, L. Utilisatio d'une substance active "JYP" present dans l'eau de coco pour la conservation 'in vitro'et la fertilité des spermatozóides des mammifers. S.I.: 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.; 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. *Rev. Bras. Reprod. Anim*. v. 22, n. 2, p. 109-112, 1998.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. *Rev. Cient. Prod. Animal*. v.1, n. 1, p. 17-26, 1999.

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

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 ºC. *Small Rum. Res.* 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 ºC. *Anim. Reprod. Sci*. 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: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Olinda. *Anais*...Olinda, p.540. 1994

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of goat. *Nature*. 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.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Anim. Sci. Reprod*., v. 62, p. 77-111, 2000.

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

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.C.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reprod. Fertil. Dev*., v. 10, p. 347-357, 1998.

SCHEID, I.R. O papel da inseminação artificial na produção de suínos. In: II SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, Fortaleza, *Ciência Animal*, v. 7, n. 2, jul/dez. 1997. Anexos.

SHORE, M.D., MACPHERSON, M.L., COMBES, G.B., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. *Theriogenology*, v. 50, p. 693-698, 1998.

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*, v. 10, supl., 1, p. 148-149, 2000.

SOUSA, N.M., TEIXEIRA, M.D.A.; OLIVEIRA, L.F. Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidores do sêmen ovino. In: XXIII CONGR. BRAS. MED. VET., Olinda. *Anais*...Olinda, p. 583, 1994.

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. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, supl., n. 5, p. 103-105, 2002.

SQUIRES, E.L., BRUBAKER, J.K., MCCUE PICKEETT, B.W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*, v. 49, p. 743-749, 1998.

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. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.13, p. 209-220, 1989a.

TONIOLLI, R. Conservação do sêmen suíno em água de coco. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 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. *Rev. Bras. Reprod. Anim.,* 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 proloficité de truies. *Journées Rech. Porcine France*, v. 27, p. 67 – 70, 1995.