



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

***Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen eqüino
diluído em água de coco em pó (ACP-105) e
resfriado a 5°C***

JOSÉ AMORIM SOBREIRA NETO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2008**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen eqüino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C

JOSÉ AMORIM SOBREIRA NETO

ORIENTADOR: JOSÉ AMÉRICO SOARES GARCIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 314/2008

BRASÍLIA/DF
MARÇO/2008

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen eqüino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C

JOSÉ AMORIM SOBREIRA NETO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO ANIMAL.

APROVADA POR:

JOSÉ AMÉRICO SOARES GARCIA, Doutor - Universidade de Brasília
(Orientador); CPF: 674.280.106-91 Email: jasgarcia@unb.br

JAIRO PEREIRA NEVES, Doutor - Universidade de Brasília
(Co-Orientador); CPF: 065.863.509-30 Email: jpneves@unb.br

CAROLINA MADEIRA LUCCI, Dra. Universidade de Brasília
(Examinadora Interna); CPF: 490.390.241-20 Email: cmlucci@unb.br

CRISTIANE CLEMENTE DE MELLO SALGUEIRO, Ph.D.
Universidade Estadual do Ceará - UECE
(Examinadora externa); CPF: 692.459.753-04; Email: crismello76@hotmail.com

BRASÍLIA/DF, 25 DE MARÇO DE 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Sobreira Neto, José Amorim

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen eqüino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C.

José Amorim Sobreira Neto; orientação de José Américo Soares Garcia. Brasília, 2008.

61 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. Diluente. 2. Sêmen. 3. Eqüinos. 4. Inseminação Artificial. I. Garcia, J. A S. II. Doutor.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SOBREIRA NETO, J. A. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen eqüino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 61 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: José Amorim Sobreira Neto

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Avaliação "*in vitro*" e "*in vivo*" do sêmen eqüino diluído em água de coco em pó (ACP-106) e resfriado a 5°C.

GRAU: Mestre ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

José Amorim Sobreira Neto

CPF 410. 104. 263 - 20

Quadra 204, lote 08, Bloco A, Apto 1001.

CEP: 71.939-540 – Águas Claras/DF - Brasil

Telefone: (55-61) 9986-3847 / 8112-4647. Email: amorimsobreira@terra.com.br

À Deus, pelos dons recebidos, por me proporcionar um momento tão importante e sublime em minha vida profissional e por me conceder a paz nas horas mais difíceis;

Aos meus pais, Everardo e Tereza, pelo exemplo de garra e superação nos momentos em que a vida se mostrou mais adversa;

À minha querida esposa Morgana, pela dedicação e companheirismo desde o início de nosso caminho juntos;

Aos meus filhos Igor e Luca, por me cercarem de amor, carinho e muita de alegria nos momentos mais complicados desta jornada;

Aos meus irmãos Alexandre e Gustavo, pelos incentivos e dedicações demonstradas nas mais variadas situações.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, professor Dr. José Américo Soares Garcia, pela amizade e confiança depositadas no meu trabalho.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Jairo Pereira Neves, pela colaboração.

À amiga, Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pela grande ajuda, dedicação, confiança e incentivos desde o início das atividades.

À professora, Dra. Connie, pelo apoio nas análises estatísticas.

Ao grande professor, Dr. José Ferreira Nunes, pela oportunidade de trabalhar com o ACP e pela convivência, servindo-me de modelo de profissionalismo e dedicação à ciência.

Ao professor João Monteiro Gondim (*“in memoriam”*), com quem tive o prazer de contar com um pouco do seu vasto conhecimento no início desta caminhada.

Ao criador Givaldo Francisco de Meneses, pela oportunidade de desenvolver os trabalhos nas dependências do Haras do Peixe.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de poder graduar-me como mestre.

À CAPES, pelo incentivo da concessão da bolsa para mestrando.

Agradeço.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE QUADROS, GRÁFICOS, TABELAS E FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. O Sêmen Eqüino	03
2.2. Estrutura do Espermatozóide	03
2.3. O Plasma Seminal	05
2.4. Capacitação Espermática	07
2.5. Resposta ao Resfriamento	08
2.6. Diluentes de Sêmen	09
2.7. Diluentes à Base de Água de Coco	11
2.8. Sistemas de Refrigeração	17
2.9. Fatores que Afetam a Fertilidade do Sêmen Eqüino Resfriado	18
2.10. A Inseminação Artificial e a Fêmea Eqüina	20
3. JUSTIFICATIVA.....	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo geral	24
4.2. Objetivos específicos	24
5. CAPÍTULO ÚNICO. Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do sêmen eqüino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C	25
RESUMO GERAL	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADO E DISCUSSÃO	36
CONCLUSões E CONSIDERAÇÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE QUADROS, GRÁFICOS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

	Pág.
Quadro 1 – Composição da água de coco anão maduro	12
Gráfico 1 – Curva de motilidade, com a respectiva equação de regressão, do diluente ACP-105 ao longo dos tempos 2, 24, 36 e 48 horas de resfriamento e estocagem a 5°C	38
Gráfico 2 – Curva de motilidade, com a respectiva equação de regressão, do diluente Equimix ao longo dos tempos 2, 24, 36 e 48 horas de resfriamento e estocagem a 5°C	39
Tabela 1 – Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado (adaptado de Nunes <i>et al.</i> , 2006).....	22
Tabela 2 – Média e desvio padrão da motilidade total (%) do sêmen eqüino diluído em ACP-105 e Equimix [®] , refrigerado e conservado a 5º por até 48 horas	36
Tabela 3 – Taxa de prenhez de éguas inseminadas artificialmente com sêmen dos garanhões 3 e 4 diluído em ACP-105 com 24 (ACP24) e 36 (ACP36) horas de conservação a 5°C	40
Tabela 4 – Custo e benefício comparativo entre os diluentes ACP-105 e Equimix [®]	42
Figura 1 – Diagrama ilustrativo da primeira fase do experimento	31
Figura 2 – Diagrama ilustrativo da segunda fase do experimento	34
Anexo I – Certificado Andrológico	60
Anexo II – Controle Reprodutivo	61

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

ACIN	água de coco <i>in natura</i>
ACP	água de coco em pó
A.I.E.	Anemia Infeciosa Eqüina
AMP _c	adenosina monofosfato cíclico
ATP	trifosfato de adenosina
BSP	<i>Bovine Seminal Protein</i> – proteína seminal bovina
Ca ²⁺	íon cálcio
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
Cl ⁻	íon cloro
CO ₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
H ₀	hipótese inicial
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HSP	<i>Horse seminal protein</i> – proteína seminal eqüina
IA	inseminação artificial
IAA	ácido 3-indol acético
IMV	Instrumentos Médico-Veterinários
IV	intravenoso
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IM	Intramuscular
K ⁺	íon potássio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg ²⁺	íon magnésio
MHz	Mega Hertz
MIP	motilidade individual progressiva
mOsm	miliosmoles
Na ⁺	íon sódio
PEM	porcentagem de espermatozóides móveis
pH	potencial hidrogeniônico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> – espécie reativa ao oxigênio
r.p.m.	rotações por minuto
SAS	statistical analysis system
Spz's	espermatozóides
TRIS	diluyente à base de TRIS (hidroximetil) aminometano
UI	unidades internacionais
°C	graus Celsius
x 10 ⁶ /mL	milhões por mililitro
x 10 ⁹ /mL	bilhões por mililitro

RESUMO GERAL

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen eqüino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C.

A reprodução eqüina moderna, em muitos rebanhos, é baseada no uso da inseminação artificial (IA). A difusão do uso da IA pelo mundo tem acelerado o progresso genético pela seleção de garanhões aptos para cruzamento que estão fora do país ou da região onde são mantidos. Quando o transporte do sêmen desde o centro de coleta ao local onde as éguas vão ser inseminadas pode ser alcançado dentro de aproximadamente 24 horas, o sêmen refrigerado, em muitos casos, é preferível ao sêmen congelado devido a sua melhor capacidade fertilizante. O objetivo deste experimento foi o de avaliar a viabilidade do meio diluente para sêmen eqüino à base de água de coco em pó (ACP-105) no resfriamento do sêmen a 5°C. Foram utilizados 25 ejaculados de 05 garanhões distintos das raças árabe, mangalarga marchador e campolina, de comprovada fertilidade, com idades entre 36 e 120 meses. O sêmen foi avaliado a fresco quanto aos parâmetros de volume, concentração, motilidade total e vigor e quanto aos últimos dois, pós-diluição, em ACP-105 e Equimix[®] (à base de leite desnatado e glicose) nos tempos de conservação de 2, 12, 24, 36 e 48 horas. A motilidade total não apresentou diferença estatística ($p < 0.05$) até 36 horas de conservação. Após 48 horas de estocagem, a motilidade total caiu para menos de 10%. Foram inseminadas 14 éguas com sêmen conservado com o diluente ACP-105 por 24 e 36 horas, sendo observadas taxas de prenhez de 57,1 e 35,7%, respectivamente. Como demonstrado no trabalho, o diluente ACP-105 torna-se uma alternativa biotecnológica satisfatória para a refrigeração de sêmen eqüino.

Palavras chaves: eqüino, diluente, ACP-105, inseminação.

ABSTRACT

Evaluation *in vitro* and *in vivo* of equine semen extended in powder coconut water (PCW-105) and cooled at 5°C

Modern horse reproduction, in most breeds, is based on the use of artificial insemination (AI). The wide-spread use of AI has accelerated genetic progress by making selected stallion available to breeders outside the country or region where the stallion is located. When transport of semen from the collection centre to the place where the mare is to be inseminated can be organized within approximately 24 hours, cooled semen, in most cases, is preferred to frozen semen because of its better fertilizing capacity. The aim of this study was to evaluate the viability of the extender to equine semen based on powder coconut water (PCW-105) on the cooling semen at 5°C. Were used 25 ejaculates from 05 stallions from arab, mangalarga marchador and campolina breeds, with proved fertility, with ages between 36 and 120 months. Semen was evaluated fresh for volume, concentration, total motility and vigor and respect to the last two, after dilution, on PCW-105 and Equimix[®] (based on skim milk and glucose) at the conservation times of 2, 12, 24, 36 and 48 hours. There wasn't statistical differences in total motility ($p < 0.05$) till 36 hours of conservation. After 48 hours, total motility decreased to less than 10%. 14 mares were inseminated with semen conserved in extender PCW-105 by 24 and 36 hours, with pregnancy rates of 57,1% and 35.7%, respectively, showing that is a satisfactory biotechnological alternative to the refrigeration of equine semen.

Key words: equine, extender, PCW-105, insemination.

1. INTRODUÇÃO

A primeira inseminação artificial de que se tem registro, foi realizada pelos árabes em 1332 (Mies Filho, 1987), porém a primeira inseminação artificial (IA) cientificamente registrada foi realizada na espécie canina e descrita por Lázaro Spalanzani em 1779 em Padova, na Itália, onde após 62 dias da IA, houve o nascimento de três filhotes saudáveis (apud Badinand et al., 1990). Atualmente, esta é uma biotecnologia bastante difundida na reprodução assistida de diversas espécies (Feldman & Nelson, 1996).

A IA vem tornando-se usual também entre os veterinários que trabalham com melhoramento genético (Silva et al., 2000; Uchoa et al., 2000, 2002ab). Esta técnica possibilita a eliminação do estresse causado pelo transporte dos animais no momento do acasalamento, quando estes se encontram em regiões geograficamente distintas, diminuindo os custos de transporte do material genético; e possibilita a proteção de animais valiosos serem submetidos ao risco de doenças sexualmente transmissíveis como anemia infecciosa eqüina (A. I. E.), herpesvírose, durina, brucelose, micoplasmose, entre outras. A IA é freqüentemente utilizada também nos casos de não reconhecimento do macho pela fêmea, ou vice-versa, e nos casos de agressividade, inerente à raça, fatos estes que ocorrem normalmente por erros no manejo dos animais. Pode-se ainda usar a IA a fim de diminuir os índices de consangüinidade e taras hereditárias. A IA permite ainda otimizar uma coleta de sêmen de um reprodutor para diversas fêmeas e perpetuar as características de animais de alto valor genético e principalmente zootecnicamente superiores (Silva et al., 2003).

Vários diluentes vêm sendo utilizados e testados *in vitro e in vivo* onde se procura, principalmente, a durabilidade e qualidade dos espermatozóides tentando-se viabilizar ao máximo o material genético masculino.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a água de coco pode exercer ação benéfica sobre a conservação celular. Entretanto, o número de estudos realizados no sentido de testar a eficiência da mesma e sua viabilidade ainda é escasso, principalmente com eqüinos. Além disso, a adoção de diluentes de fácil obtenção e emprego pode contribuir para a redução dos custos na inseminação artificial. A água

de coco tem-se demonstrado um diluente adequado e satisfatório para este fim. Seu uso na forma em pó (ACP-105) possibilita um melhor armazenamento, conservação, disponibilidade e distribuição para regiões em que há dificuldades na obtenção da matéria-prima.

Para tal fim, Salgueiro et al. (2002) desenvolveram, através de um processo de desidratação à alto vácuo, a água de coco padronizada na forma de pó (ACP[®]), permitindo a conservação das suas características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se dispõe do fruto. A fim de comprovar a eficiência do meio de conservação de espermatozóides de eqüídeos à base de água de coco em pó (ACP-105), Sampaio Neto (2002) testou na espécie eqüina *in vitro* apresentando resultados satisfatórios na motilidade dos espermatozóides até 6 horas de estocagem a 5°C.

O uso do ACP-105 pode representar uma excelente alternativa para o desenvolvimento da biotecnologia, visando o melhoramento genético eqüino. Além disso, esse método de diluição de sêmen poderá futuramente ser aplicado em eqüídeos ameaçados de extinção como o jumento da raça Pêga e o jumento nordestino que necessitam de melhores taxas de gestação e prolificidade. Assim, este trabalho teve por objetivo o incremento de estudos com o ACP-105 no uso da inseminação artificial com sêmen resfriado para eqüino, o tempo de estocagem e a melhoria na qualidade do sêmen, de modo a garantir a qualidade dos trabalhos a campo e o sucesso nos programas de melhoramento genético.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Sêmen Eqüino

Segundo Mies Filho (1987), sêmen ou esperma trata-se do conjunto de secreções próprias do aparelho genital masculino, caracterizado pela presença do espermatozóide o qual é expulso pela ejaculação durante o ato da cópula.

2.2. Estrutura do Espermatozóide

Os primeiros estudos sobre o sêmen eqüino datam de 1678, quando o pesquisador Von Leuwenhoeck atribuiu aos espermatozóides o título de “parasitas” do plasma seminal. Em 1830 foram os pesquisadores Prevost & Dumas que demonstraram que os espermatozóides, nome batizado por Von Baer (1827), eram essenciais para a fertilidade. Em 1841, 163 anos depois dos primeiros estudos, Von Kolliker comprovou que espermatozóides eram provenientes de divisões celulares nos túbulos seminíferos (Hirsh, 1992).

Segundo Amann & Graham (1993), para que o espermatozóide fertilizar um óvulo, este tem que apresentar principalmente as seguintes funções: 1) processo metabólico para a produção de energia; 2) motilidade progressiva; 3) proteínas necessárias para a sua sobrevivência no trato genital feminino; 4) enzimas, principalmente no acrossoma, para penetrar nas estruturas do ovócito, 5) uma membrana plasmática com uma distribuição própria de lipídios e 6) proteínas que permitam a reação acrossomal de se ligar e fundir com o ovócito.

O espermatozóide é revestido por uma membrana plasmática lipoprotéica, porém a composição e a disposição dos lipídios e proteínas é diferente para cada parte específica, pois vai depender da função de cada porção, como, por exemplo, na cabeça, onde a membrana que cobre a vesícula acrossomal se fundirá com a membrana plasmática para haver a liberação de seu conteúdo, enquanto que as demais partes da cabeça e peças intermediárias, principal e final não têm esta função de troca de material, por isso permanecem intactas. Reprodutores devem ser

bem manejados para terem estas características constantes, principalmente durante a estação de monta e particularmente se forem destinados a programas de resfriamento ou congelamento de sêmen (Amann & Graham, 1993).

A membrana plasmática do espermatozóide é composta por dupla camada de lipídios, proteínas e carboidratos (Amann & Graham, 1993). As proteínas, integrais ou periféricas, atuam com receptores associados à interação com o ovócito e como bombas de cálcio, sódio e outros íons (Graham, 1996). Os carboidratos são responsáveis pela adesão entre as células, como a ligação entre o espermatozóide e o ovócito, e são encontrados na superfície da membrana plasmática (Alberts, 1997). Os fosfolipídios, compostos por uma alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, garantindo a fluidez da membrana; os esteróis, sendo o colesterol o principal, e os glicolipídios são os principais lipídios encontrados na membrana plasmática (Amann & Graham, 1993).

A cabeça tem uma forma ampla e relativamente plana. Contém o núcleo (DNA) e o acrossoma (enzimas). A membrana acrossomal é composta para se misturar ou fundir com a membrana plasmática (processo este chamado de vesiculação) e liberar as enzimas ajudando na penetração da zona pelúcida do ovócito. Essa vesiculação é conhecida como reação acrossomal. As proteínas na membrana plasmática da cabeça fazem com que o espermatozóide se ligue primeiro aos receptores da zona pelúcida e depois à membrana plasmática do ovócito durante a fertilização. De acordo com Amann & Graham (1993), a capacidade de se regenerar do espermatozóide é inibida devido à alta condensação do DNA que dessa forma não fornece modelos para o RNAm devido à compactação, para que ocorra produção protéica. Sendo assim, uma vez danificada, a célula morre.

O pescoço serve apenas para ligar a cabeça à peça intermediária; é relativamente frágil e a separação dessas porções ocorre devido a danos, geralmente mecânicos, a essas estruturas (Baumgartl et al., 1980).

A peça intermediária, segundo Amann & Graham (1993), é denominada “casa de força”, pois contém as mitocôndrias que convertem glicose em ATP e mandam energia para as demais organelas; a peça intermediária ainda possui feixes de fibras que se alongam pela cauda de espermatozóide e são responsáveis pelo movimento.

Na peça principal, as fibras iniciadas na peça intermediária, continuam por ela e são envolvidas por uma bainha protéica; a movimentação ocorre devido a essas fibras que deslizam entre si para frente e para trás, umas sobre as outras,

provocando, dessa forma, um movimento sincronizado da célula espermática (McKinnon & Voss, 1993).

As fibras da cauda, iniciadas na peça intermediária, terminam na peça final, última porção do espermatozóide e é neste local em que a membrana plasmática se insere de forma cônica (Squires et al., 1999).

Para fertilizar um óvulo, o espermatozóide deve possuir todas estas partes e componentes íntegros e funcionando perfeitamente. De acordo com Amann & Graham (1993) o espermatozóide deixa de ter capacidade fértil por algumas razões, dentre elas o acrossoma pequeno ou danificado; membrana plasmática rompida; função mitocondrial diminuída; motilidade baixa ou ausente; etc. Contudo, o espermatozóide que tenha problemas no acrossoma detectado durante uma coleta, ou resfriamento, ou ainda no descongelamento é tão estéril quanto aquele com imobilidade. Dessa forma os animais destinados à reprodução têm que ter todos os componentes e funções dos espermatozóides em máximo potencial de fertilidade, comprovados através de exames periódicos.

2.3. O Plasma Seminal

Trata-se do líquido produzido a partir da *retis testis*, epidídimo e glândulas acessórias. Contém inúmeros componentes de grande importância para a sobrevivência e funcionamento do espermatozóide (Edwards et al., 1981). As funções básicas são nutrição, veículo e diluição dos espermatozóides, segundo Miller et al. (1990). O sêmen (plasma seminal + espermatozóides) possui substâncias enzimáticas e não enzimáticas que servem como mecanismo de defesa contra ROS (*Reactive Oxygen Species*); além dessas, possui outras que funcionam como agentes antioxidantes como as vitaminas A e C, urato, albumina, taurina e hipotaurina (Baumber et al., 2000; Almeida & Ball, 2005).

A proteção contra ROS e prevenção contra danos celulares através das substâncias antioxidantes são fatores fundamentais para o potencial reprodutivo, já que a baixa capacidade antioxidante total encontrada no sêmen possui correlação direta com os índices de infertilidade (Guerra et al., 2004).

Existem vários componentes orgânicos e inorgânicos no plasma como aminoácidos, proteínas, íons (Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , entre outros), bicarbonato,

frutose, sorbitol, inositol, ergotiomina, glicerilfosforilcolina, ácido cítrico, ácido ascórbico, lipídios, enzimas, antimicrobianos, imunoglobulinas e uma variedade de substâncias hormonais, todas em quantidades variadas (Garner & Hafez, 2004).

As secreções do trato reprodutivo não são descarregadas simultaneamente durante a ejaculação. Desta maneira, o ejaculado do garanhão consiste de cinco a oito jatos (frações) frutos de contrações uretrais que podem ser divididas em três fases distintas. Estas fases diferem entre si por sua composição química, onde 70% dos espermatozóides estão presentes na fase intermediária. A primeira fase é derivada das glândulas bulbo-uretrais, é translúcida e geralmente ausente de espermatozóides, servindo para limpeza da uretra. Em seguida vem a fração rica em espermatozóides, com secreções da próstata e ampolas; a terceira fração, com uma menor quantidade de espermatozóides, é acompanhada da secreção das vesículas seminais (Varner et al., 1987; Kareskoski et al., 2005).

Apesar de sua reconhecida importância para a manutenção dos espermatozóides, vários protocolos de resfriamento e congelamento indicam a retirada total ou parcial do plasma seminal substituindo-o pelo diluente escolhido. Mesmo sabendo dessa grande importância, Amann & Pickett (1987) indicam a remoção, principalmente para sêmen criopreservado. Porém poucos trabalhos existem indicando, de fato, ser benéfico ao espermatozóide criopreservado. Alguns trabalhos ainda indicam que o plasma seminal é benéfico para os espermatozóides da espécie eqüina criopreservados (Aurich et al., 1996; Katila et al., 2002). Almeida (2006) indica a utilização de no máximo 25% do total do plasma seminal para a criopreservação, uma vez que uma quantidade maior, observou redução na viabilidade e motilidade dos espermatozóides. Raphael (2007) aconselha a retirada do plasma seminal ao máximo, onde observou a melhoria nas características do sêmen até 24 horas de estocagem a 5°C.

No plasma seminal de bovinos foram identificadas proteínas que se ligam aos fosfolipídios, denominadas BSP (*Bovine Seminal Protein*), que apesar de várias ações em prol da fertilização, são danosas à preservação espermática (resfriamento ou congelamento), pois induzem à saída de lipídios da membrana plasmática. Dessa forma a exposição contínua dos espermatozóides ao plasma seminal causa uma efusão contínua de colesterol da membrana plasmática deixando os espermatozóides sensíveis à preservação a baixas temperaturas (Garner & Hafez, 2004). Nos garanhões, têm-se uma proteína semelhante à BSP; a HSP1, HSP-2 e

HSP-12 (*Horse Seminal Protein*), correspondendo a 20% da proteína total do ejaculado. Seus efeitos deletérios são minimizados pela adição de diluentes à base de gema de ovo ou leite em pó, uma vez que as lipoproteínas e a caseína (proteínas do ovo e do leite, respectivamente) se ligam à algumas proteínas que causam o efluxo de lipídios da membrana, influenciando positivamente e preservação dos gametas em contato com o frio (Bergeron & Manjunath, 2006).

Para minimizar os efeitos destas proteínas, podem ser utilizados métodos tais como, centrifugação, colheita fracionada do sêmen ou mesmo lançar mão de altas diluições, sendo este último o método mais utilizado. A centrifugação é rotineira em protocolos de criopreservação para concentrar a fração espermática e amenizar os efeitos deletérios do plasma seminal (Jasko et al., 1991; Brinsko et al., 2000). Pickett et al. (1975) demonstraram que altas concentrações de plasma seminal em sêmen diluído foi deletéria para o sêmen eqüino e bovino resfriado. Braun et al. (1994) observaram que a motilidade espermática de sêmen resfriado foi melhor com a adição de 25% do plasma seminal, quando comparado com sêmen sem plasma seminal.

2.4. Capacitação Espermática

O tempo previsto para que ocorra a capacitação espermática, provavelmente depende da velocidade de efluxo de colesterol. Baseando-se nessa idéia, espécies como bovinos e humanos precisam de período maiores para uma melhor capacitação (6 e 8 horas, respectivamente), enquanto que a espécie ovina, por possuir uma pequena quantidade de colesterol, precisa apenas de 1 a 2 horas para capacitação (Yanaguimachi et al., 1994).

Protossomas (vesículas ricas em colesterol) são encontradas no plasma seminal de homens e garanhões, bloqueando o efluxo de colesterol das células espermáticas, retardando, dessa forma, a capacitação espermática (Cross, 1998).

De acordo com Yanaguimachi et al. (1994) mudanças fisiológicas na membrana plasmática da célula espermática são imprescindíveis e essenciais para o processo de capacitação, ativando a capacidade fertilizante das células produzindo uma hipermotilidade no deslocamento dos espermatozóides.

Segundo Morris (2000) danos à membrana plasmática dos espermatozóides resultam em perdas irreversíveis na sua motilidade e capacidade fertilizante. Durante a ejaculação, os espermatozóides podem sofrer danos à membrana plasmática que podem resultar em morte celular, principalmente no trato genital feminino. Por isso é que, dos bilhões de células espermáticas ejaculadas, somente algumas centenas ou mesmo milhões chegam a entrar em contato com o óvulo.

2.5. Resposta ao Resfriamento

O resfriamento do espermatozóide eqüino a 5°C induz à transição da membrana espermática do estado líquido-cristalino para o estado de gel. O sêmen estando à temperatura corporal, o metabolismo do espermatozóide é máximo e, à temperatura ambiente, é alto. Assim, antes de ocorrer o resfriamento, formam-se algumas substâncias tóxicas provenientes desse metabolismo, como CO₂ e o ácido láctico, que podem diminuir o pH do sêmen causando danos permanentes; a peroxidação lipídica, por exemplo, causa danos irreversíveis (Baumgartl et al., 1980).

Segundo Amann & Pickett (1987), para cada 10°C de redução na temperatura, o metabolismo celular reduz-se em 50%; dessa forma, um espermatozóide estocado a 5°C tem apenas 10% do metabolismo de um espermatozóide estocado a 38°C. Portanto, este sêmen estocado a 5°C, produz muito menos produtos tóxicos maléficos, fruto deste metabolismo reduzido, e a peroxidação lipídica da membrana plasmática ocorre mais lentamente, elevando o tempo de sobrevivência da célula. Todos esses fatores de resfriamento, juntos, tendem a aumentar a vida fértil dos espermatozóides quando comparados àqueles à temperatura ambiente ou corporal.

Certamente algumas atitudes devem ser tomadas para que os danos causados pelo resfriamento aos espermatozóides sejam minimizados, como a diluição; porém nem todos podem ser eliminados completamente. De acordo com Pickett et al. (1999), diluindo-se o sêmen na proporção de 1:1 (diluente:sêmen, respectivamente) com aditivos e substratos para proteção da membrana e fazendo-se o controle do resfriamento, esses efeitos danosos podem ser minimizados. Quando esses passos são dados, se pode preservar os espermatozóides de um garanhão por no mínimo 2

horas, sem haver redução no potencial de fertilização e, quando congelados, por vários anos.

2.6. Diluentes de Sêmen

Amman & Pickett (1987) relatam que numerosas são as razões para se utilizar um diluente de sêmen. Dentre elas pode-se destacar a utilização de antibióticos para o tratamento do sêmen, minimizando os riscos de transmissão de organismo patogênicos; aumentar a longevidade dos espermatozóides; proteção do espermatozóide (sêmen) das condições ambientais desfavoráveis; aumentar o volume inseminante; promover uma melhora na motilidade espermática; prover nutrientes para aumentar a sobrevivência dos espermatozóides.

As principais características de um bom diluente são: 1) osmolaridade compatível (300-400 mOsm/Kg); 2) balanço próprio dos elementos minerais (eletrólitos e não-eletrólitos); 3) combinação apropriada de nutrientes; 4) neutralização de produtos tóxicos; 5) proteção em caso de mudança brusca de temperatura; 6) estabilizar o sistema enzimático; e 7) garantir a integridade da membrana plasmática (Amman & Pickett, 1987; Melo, 2005).

Numerosos diluentes, segundo Amman & Pickett (1987), têm sido desenvolvidos para sêmen eqüino à base de numerosos componentes, onde se pode incluir o ovo e o leite, acrescido ou não de substâncias para equilibrar o pH e a osmolaridade.

A gema de ovo é utilizada para proteger os espermatozóides do choque térmico. Provavelmente esta proteção é devida à presença de lipoproteínas de baixa densidade, porém seu mecanismo ainda é obscuro. Dentre as hipóteses sugeridas para este mecanismo de proteção estão: a associação destas lipoproteínas à membrana, estabilizando-a; a formação de uma película protetora de fosfolipídios na superfície da membrana; reposição dos fosfolipídios da membrana e competição por sítios de ligação na membrana com peptídeos deletérios presentes no plasma seminal (Bergeron & Manjunath, 2006). Apesar do efeito protetor, a gema do ovo contém progesterona, que pode levar a uma capacitação espermática precoce e conseqüente redução da fertilidade (Lipar et al., 1999). Outro problema é a hidrólise

das lecitinas da gema do ovo, resultando na formação das lisolecitinas que causam a desestabilização da membrana (Ritar & Salamon, 1982).

O leite é um fluido biológico, complexo em sua composição. Sua proteção parece não estar relacionada aos lipídios, mas sim às proteínas e carboidratos, que além de auxiliar no tamponamento fisiológico, também promovem uma proteção celular. Dentre os constituintes do leite, a caseína, proteína do leite, é apontada por proporcionar a maior proteção (Battelier et al., 2001; Pommer et al., 2002; Bergeron & Manjunath, 2006). Entretanto, devido à sua complexidade o leite pode apresentar componentes que podem ser benéficos, como também maléficos ao espermatozóide. Além disso, as substâncias benéficas podem não estar presentes em concentrações adequadas e outros podem ter efeitos negativos sobre os espermatozoides (Battelier et al., 1997, 2001; Leboeuf et al., 2003). Estes estudos mostram que a fosfocaseinato nativa, uma proteína composta por micelas de caseínas e β -lactoglobulinas, proteína solúvel de maior quantidade no leite, possuem atividade protetora para os espermatozoides, sendo que esta proteção pode ser devida a uma possível ação antioxidante destas proteínas. No entanto, a α -lactoalbumina, outra proteína solúvel, foi prejudicial à sobrevivência dos espermatozoides. Baseado neste estudo foi desenvolvido um diluente a base de uma solução de sais e suplementado com a fosfocaseinato nativa (INRA 96[®], IMV Technologies).

A maioria dos diluentes de sêmen para resfriamento é produzida à base de leite em pó desnatado, glicose e antibióticos (Kenney et al., 1975). Geralmente algumas substâncias são adicionadas a esta fórmula básica para preservar ou mesmo melhorar as características espermáticas, tais como quelantes (EDTA) que se ligam ao Ca^{2+} e Mg^{2+} , reduzindo a perda de íons intracelulares, amenizando as lesões causadas pelo choque térmico (Amann & Graham, 1993); antioxidantes, que são úteis para preservar a motilidade e a integridade da membrana plasmática, aumentando a longevidade do sêmen (Aurich et al., 1997; Bruemmert et al., 2002; Almeida & Ball, 2005); indutores de funcionalidade, tais como a teofilina, cafeína e pentoxifilina, aumentando a motilidade espermática, devido a um aumento intracelular da quantidade de AMPc (Marques et al., 2002; Goulart et al., 2002). Os aminoácidos, como a glicina e taurina, também já tiveram sua eficiência comprovada na manutenção da motilidade e viabilidade do sêmen resfriado (Carvalho, 2003).

Vários diluentes estão disponíveis no mercado diferindo principalmente em relação à composição dos antibióticos e açúcares (Squires et al., 1999). Dentre os produzidos no país, destacam-se o Botu-Sêmen[®], Botu-Turbo[®], Max-Sêmen[®], Max-Sêmen Plus[®] e o Equimix[®], sabendo-se que as denominações “plus” e “turbo” são indicadas para garantias com baixa resistência a refrigeração devido ao acréscimo de substâncias promotoras de motilidade e que aumentam a sobrevivência dos espermatozoides.

2.7. Diluentes à Base de Água de Coco

A água de coco é uma solução levemente ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (Nunes & Combarous, 1995). Além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporciona os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade de gametas masculinos e femininos criopreservados (Blume & Marques Jr., 1994). A composição química da água de coco maduro, variedade anã, é mostrada no Quadro 1.

Quadro 1 – Composição da água de coco variedade anã maduro

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 Hidroxipolina	Traços
Homoserina	5,2
Leucina	31,7
Lisina	22,5
Prolina	21,6
Serina	65,8
Tirosina	3,1
Treonina	26,3
Valina	15,1
Açúcares	
Frutose	8,9
Glicose	2,46
Sacarose	2,51
Vitaminas	
Ácido fólico	0,003
Ácido nicotínico	0,64
Ácido pantotéico	0,52
Biotina	0,02
Tiamina e Piridoxina	0,01
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 & Combarous (1995).

A água de coco apresenta com 2.5 a 5.9 g/100 mL de açúcares redutores, não causando hemólise no sangue humano *in vitro* ou *in vivo* (Eisemann, 1954).

Laguna (1996) estudou a composição físico-química da água de coco verde em duas variedades, coco da praia e anão, com idade de 6-7 meses aproximadamente, e verificou que a variedade coco anão apresentou valores médios superiores para o peso do fruto, diâmetro do alúmen, brix (sólidos solúveis), acidez titulável e osmolaridade, sendo o pH similar para as duas variedades. De um modo em geral, a água de coco da variedade anã é mais pobre em eletrólitos e glicídios que o coco da praia, apresentando este uma concentração duas vezes superior de fosfatos, potássio e proteínas, sendo a concentração de frutose sete vezes mais elevada que o coco anão (Pinto & Oliveira, 1962).

Na Índia, foram isoladas e identificadas na água de coco, substâncias promotoras do crescimento, como, citocininas endógenas e ainda traços de zeatina ribozídeo. A zeatina é a citocina natural mais ativa, sendo dez vezes mais potente que a cinetina. Têm sido demonstrados vários efeitos das citocinas sobre importantes processos fisiológicos como a floração, expressão sexual e formação de frutos (Nunes & Salles, 1993).

A água de coco verde contém substâncias promotoras de crescimento ainda não identificadas, com muito pouco ácido ascórbico, pouca proteína e cerca de 5% de carboidratos, principalmente açúcares (De Martin, 1980).

A água de coco tem sido utilizada em biotecnologias da reprodução animal obtendo-se bons resultados com a utilização da água de coco na preservação do sêmen de animais domésticos como caprinos (Freitas, 1988; Salles, 1989; Toniolli, 1989a; Araújo, 1990; Rodrigues et al., 1994; Salgueiro et al., 2003), ovinos (Freitas, 1992; Cruz, 1994; Sousa et al., 1994; Salgueiro et al, 2004), suínos (Toniolli, 1989b; Toniolli e Mesquita, 1990), caninos (Montezuma Jr. et al., 1994; Uchoa et al., 2002b), peixe de água doce como o Tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER) (Farias et al, 1999), bem como do homem (Royere et al., 1994, citado por Nunes e Combarrous, 1995).

Os primeiros trabalhos utilizando a água de coco como diluente seminal foram realizados por Nunes (1986, 1987) com a espécie caprina, na cidade de Maceió, Alagoas, no período de setembro de 1985 a dezembro de 1987, onde o sêmen caprino foi avaliado após duas horas de incubação a 37°C, sendo observado que tanto a motilidade individual progressiva (MIP) como a porcentagem de

espermatozóides móveis (PEM) eram superiores quando o sêmen se diluía em uma solução baseada em água de coco, que em leite desnatado (Nunes & Salgueiro, 1999).

Resultados similares foram obtidos ao utilizar ambos os diluentes na refrigeração de sêmen a 4°C e em seu uso para inseminação artificial em cabras nas que se haviam sincronizado o estro com tratamentos hormonais (Nunes, 1986). Com o uso da inseminação artificial com sêmen caprino diluído em água de coco e refrigerado a 4°C se obtiveram taxas de parição superiores a 60% (Nunes, 1986).

Freitas (1988) observou 55,6% de fêmeas contra 44,4% de machos nascidos de partos de cabras inseminadas com sêmen diluído em água de coco. Salles (1989) inseminou 78 cabras com sêmen resfriado a 4°C e diluído em água de coco na forma *in natura*, estabilizada e em gel, observando as respectivas taxas de partições: 63,15%, 87,50% e 92,59%. Com relação à proporção sexual, foram obtidos valores de 83,33%, 76,00% e 67,89% de fêmeas nascidas, segundo a forma da água de coco utilizada: *in natura*, estabilizada e em gel, respectivamente.

Tratando de determinar a fração da água de coco que atua sobre os espermatozóides, Nunes et al. (1994) isolaram uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3 - indol acético (IAA), que ativa o metabolismo dos espermatozóides. A presença do IAA pode variar com o estágio de maturação e a espécie do fruto e influir nos resultados *in vitro* e *in vivo* em sêmen diluído em água de coco (Nunes & Salgueiro, 1999).

A introdução do IAA na composição dos diluentes convencionais do sêmen de diferentes espécies conferiu aos espermatozóides um aumento de motilidade, maior taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais prolongados (Nunes et al., 1994).

Royere et al. (1994) citado por Nunes & Combarous (1995) utilizaram indivíduos oligospermicos como doadores de sêmen no Hospital Breteanu em Tours, França, no setor de Reprodução Humana (CECOS). As avaliações foram realizadas incubando-se o sêmen a 37°C, após diluição em meios como MENEZO e diferentes doses de IAA (ácido 3-indol acético) - uma substância ativa encontrada na água de coco. Observou-se o movimento do flagelo, bem como a velocidade do espermatozóide em um determinado tempo e campo através de microscópio óptico. Os valores foram superiores para todas as doses do IAA em relação ao diluidor MENEZO desde o início da incubação a 37°C até 20 horas após. A menor dose de

IAA (10^{-19}), ou seja, em fantogramas, mostrou valores superiores às doses de 10ng e 100ng em relação ao diluidor testemunho (MENEZO).

Araújo & Nunes (1991) avaliando o sêmen caprino diluído e congelado em água de coco *in natura* com gema de ovo (10%) e sem gema, verificando após a descongelação que a adição da gema de ovo conferiu uma maior sobrevivência espermática *in vitro*.

Salgueiro (2003) inseminou 129 cabras com sêmen diluído e congelado em água de coco *in natura* (ACIN) ou TRIS obtendo taxas de fertilidade e prolificidade de 47,69%; 1,80 e 40,63%; 1,77, respectivamente. Quanto ao sexo da cria segundo o diluente utilizado, obteve-se 73,21% de fêmeas e 26,79% de machos com o diluente ACIN e 45,65% de fêmeas e 54,35% de machos com o diluente TRIS. As inseminações foram realizadas por via cervical e 45,79% das cabras foram inseminadas intra-uterinamente, entretanto, o local de deposição do sêmen não afetou os resultados de fertilidade.

Baseado nos bons resultados obtidos com os primeiros estudos com a água de coco *in natura* na conservação principalmente de células espermáticas realizadas pelo pesquisador José Ferreira Nunes durante as décadas de 80 e 90, foi elaborado de um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP), caracterizado pela padronização e estabilização da água de coco “*in natura*” através de um processo de desidratação e subsequente formulação de meios de conservação específicos para células e tecidos (Nunes & Salgueiro, 2005).

Desde 1997, iniciou-se um estudo que levou à padronização do fruto que seria o ideal para a utilização em processos biológicos. Uma vez selecionado o fruto ideal, buscou-se a estabilização da água de coco, fato logrado no início de 2002. O produto básico (líquido endospermico do coco), em sua forma processada, confere estabilidade e longevidade de prateleira, sem problemas de acondicionamento e supera toda e qualquer outra tecnologia de conservação, uma vez que mantém as propriedades inerentes do produto original. A uniformidade do produto, obtida mediante rigoroso controle de processamento, em condições específicas, leva à manutenção dos valores agregados do endosperma líquido do coco (Nunes & Salgueiro, 2005).

Salgueiro et al. (2003) avaliando o sêmen caprino diluído e congelado com água de coco em pó com 2,5% de gema de ovo e 7% de glicerol obteve em média,

após 5 minutos de descongelação, quanto a porcentagem de espermatozóides com motilidade total e motilidade individual progressiva 33% e 2,48%, respectivamente.

Em inseminação artificial de cabras utilizando sêmen caprino diluído em ACP-101 ou TRIS e resfriado a 4°C, obteve 50% de fêmeas prenhez no total, sendo 76% de cabras prenhez inseminadas com ACP e 24% em TRIS (Salgueiro et al., 2004).

Nunes et al. (2006), demonstraram que a fertilização de ovas com sêmen de tambaqui diluído em água de coco em pó (ACP-104) proporcionou resultados similares quando comparado ao método tradicional.

Com relação à inseminação artificial em ovelhas com uso de sêmen ovino diluído e resfriado a 4°C, Cavalcante et al. (2005) verificaram 60,34% de prenhez entre as ovelhas inseminadas com sêmen resfriado por 24h e 63,38% de fertilidade entre as ovelhas inseminadas com sêmen resfriado por 48h. Resultados semelhantes foram encontrados por Salgueiro et al. (2003), onde, de 60,87% de ovelhas prenhez, 66,67% delas foram inseminadas com sêmen ovino diluído em ACP-102 e resfriado a 4°C por 24h.

Machado et al. (2006) inseminaram 64 ovelhas sem padrão racial definido (SPRD) via cervical e laparoscópica após a sincronização do estro, sendo 37 com sêmen diluído em água de coco *in natura* (ACIN) e 27 em água de coco em pó (ACP-102), obtendo taxas de fertilidade após inseminação artificial cervical (ACIN: 25,8% vs. ACP-102: 48%; $p > 0,05$) e laparoscópica (ACIN: 72,9% vs. ACP-102: 70,3%; $p > 0,05$), não sendo as mesmas influenciadas pelo diluente utilizado. Os autores relatam ainda que a fertilidade total foi influenciada pelo método de inseminação artificial (cervical: 35,71% vs. laparoscópica: 71,8%; $p < 0,05$) e quando o diluente ACIN foi utilizado (cervical: 25,8% vs. laparoscópica: 72,9%; $p < 0,05$).

Nunes & Salgueiro (2005) inseminaram ovelhas mestiças Santa Inês durante as épocas seca ($n = 114$) e chuvosa ($n = 94$) do Nordeste do Brasil com sêmen diluído em água de coco "in natura" (ACIN) ou água de coco em pó (ACP-102) e resfriado a 4°C por 24 horas, sendo observada uma maior taxa de parição na época seca (81,58%) que na época chuvosa (63,83%), não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os diluentes utilizados: ACIN = 85% e 61,7%, e ACP-102 = 77,78% e 65,96% para as épocas seca e chuvosa, respectivamente.

Rondon (2006) trabalhou com espermatozóides de capotes (*Numida meleagris*) conservados em água de coco em pó (ACP-108) ou Ovodyl a 4° ou 15°C durante 24 horas e observou que o diluente ACP-108 apresenta maior porcentagem

de espermatozoides móveis a 4°C (74±3,7%) que a 15°C (53±3,3%) e supera, após 24 horas de conservação, o diluente comercial Ovodyl (74±3,7% vs. 60±3,0%).

Em eqüinos, Sampaio et al. (2002) observaram a motilidade dos espermatozoides resfriados à 4°C por 6 horas, notando uma média de motilidade total de 77,5% ± 7,5 e motilidade progressiva de 67,5% ± 7,5 *in vitro* mostrando um direcionamento positivo para a utilização da ACP nos eqüídeos.

2.8. Sistemas de Refrigeração

O resfriamento, segundo a literatura, pode ser efetuado de dois modos distintos, sendo um ativo e um passivo. O método de resfriamento ativo é aquele que se utiliza de refrigeradores com taxas decrescentes de temperatura extremamente controlada, o que leva à inviabilidade em nível de campo. Os mais utilizados são os sistemas passivos de resfriamento que funcionam normalmente com dispositivos recicláveis, porém controlados, para resfriamento a taxas satisfatórias, dependendo de alguns fatores tais como temperatura ambiente, volume das amostras e temperatura inicial da amostra (Valle et al., 1999).

Os sistemas passivos, mais utilizados para eqüinos, devem atender a algumas exigências tais como obtenção de taxa de resfriamento lento (ideal = -0,33°C/min); manutenção da temperatura pelo maior tempo possível após estabilização (entre 4 e 8°C); proteção do sêmen; estrutura forte que permita ser utilizado em diferentes meios de transporte; ser barato, leve e de fácil manuseio e possuir completo isolamento térmico do meio exterior (Silva Filho et al., 1994).

Existem diversos sistemas de refrigeração com diferentes taxas, tempos e períodos máximo de resfriamento. Dentre os equipamentos internacionais de sistema passivo de refrigeração, destacam-se o Equine Express[®], o Bio-Flite[®], o Expecta Foal[®], o Lane STS[®], o Equitainer I[®], o Equitainer II[®], entre outros, sendo estes dois últimos os mais empregados e conhecidos, desenvolvidos por Douglas-Hamilton et al. (1984) possuindo uma taxa de refrigeração de aproximadamente -0,3°C/min o qual, em 10 horas de armazenamento, atinge uma temperatura próxima de 5°C, tendo, segundo o fabricante, um tempo máximo de estocagem de até 70 horas. Já os modelos nacionais existentes estão em crescente desenvolvimento e aceitação devido ao baixo custo como Max-Sêmen Express[®] e o Botu-Box[®] que

apresentam temperatura final de 15°C com tempo máximo de armazenamento de 24 horas e o Botutainer[®], com tempo de estocagem máximo de 48 horas a uma temperatura final de 5°C.

2.9. Fatores que Afetam a Fertilidade do Sêmen Eqüino Resfriado

Em 1776, Spallanzani, considerado o pai da inseminação artificial, já observava que o frio sobre o espermatozóide retardava os seus movimentos e que, quando reaquecido, voltava à motilidade anterior; com o aumento da utilização do sêmen transportado, principalmente em raças cujo sêmen podem ser resfriado, precisou-se de um estudo mais aprofundado para se determinar os fatores que afetariam a sobrevivência do espermatozóide resfriado. Os estudos se concentravam nas taxas de evolução da temperatura, tempo de estocagem ou armazenamento, tipos de diluentes ou centrifugação.

Province et al. (1985) estudando o tempo e a temperatura de estocagem do sêmen, chegaram à conclusão que, dependendo do diluente, da diluição e da concentração do sêmen, este pode ser armazenado a uma temperatura mínima de 4°C por até 96 horas. Estudos posteriores revelaram ainda que o ponto crítico dessa curva de resfriamento estava entre 19°C e 8°C (*cold shock*). O choque térmico frio é a principal causa de danos à integridade da membrana plasmática, pois normalmente ela atua na manutenção do equilíbrio osmótico celular e, uma vez esta estrutura sendo danificada, ocorre a perda da homeostase, com a posterior morte celular (Amann & Pickett, 1987; Amann & Graham, 1993).

À temperatura corpórea normal, a membrana plasmática apresenta-se como um mosaico fluido onde os lipídios e proteínas estão em constante movimento garantindo a sua funcionalidade (Jasko, 1994). Com a redução da temperatura, os lipídios passam de um estado fluido e desorganizado para um estado semelhante ao gel, onde as cadeias de ácidos graxos são rígidas e paralelas (Amann & Graham, 1993). Este evento, chamado de fase de transição lipídica, ocorre a uma temperatura específica para cada tipo de lipídio. Nos eqüinos, a fase de transição dos fosfolipídios inicia-se ao redor de 20,7°C (Parks & Lynch, 1992). Esta mudança de temperatura restringe a mobilidade das proteínas, passando a não ter mais fluidez na membrana, alterando a sua função. Com o avanço do frio, o arranjo desta

dupla camada de fosfolipídios poderá não ser mais mantido ocorrendo assim a ruptura da membrana (Jasko, 1994).

Esta sensibilidade dos espermatozóides aos danos causados pelo frio difere entre as espécies e provavelmente está associada à composição lipídica da membrana plasmática, sendo as mais resistentes àquelas que apresentam uma maior concentração de colesterol. No equino encontrou-se uma relação menor entre colesterol e fosfolipídios na membrana plasmática, do que nos bovinos, porém maior do que nos suínos (Parks & Lynch, 1992). O colesterol mantém o estado fluido da membrana na temperatura de transição e abaixo dela, reduzindo sobremaneira os danos à membrana plasmática. Dessa forma a adição de colesterol aos espermatozóides eqüinos antes da criopreservação aumentou a percentagem dos gametas móveis e com membranas intactas; o nível de colesterol nas membranas plasmáticas, bem como a habilidade do espermatozóide em se ligar à zona pelúcida (Parks & Graham, 1992).

Moran et al. (1992), estudando a relação entre temperatura e tempo de estocagem, recomendaram o armazenamento a 4°C com uma taxa decrescente de resfriamento de aproximadamente de 0,3°C por minuto ou menor, principalmente no intervalo de temperatura descrito por Province et al. (1985) (19 a 8°C).

Outros estudos foram realizados, considerando o tempo de resfriamento e tipos de diluentes, por Francl (1987), Francl et al. (1987) e Pickett (1993) e todos eles chegaram à mesma conclusão de que o sucesso do resfriamento a 5°C por 24 - 48 horas depende muito da fisiologia de cada animal (garanhão). Moran et al. (1992) observando a relação entre tempo e temperatura de estocagem, mostraram que no armazenamento por até 12 horas, a motilidade é a mesma, tanto estocado a 5°C, como a 20°C; porém para um tempo de estocagem maior que 12 horas, o sêmen deve ser armazenado a 5°C.

A diluição, outro fator apontado como crítico para um sêmen resfriado, foi estudado por Jasko et al. (1991, 1992ab), chegando a algumas conclusões, tais como diluições 1:1 a 2:1 (diluyente:sêmen, respectivamente), funcionam bem para inseminações à fresco onde não haja a necessidade de resfriamento. Porém para sêmen resfriado, este deve ser diluído no mínimo na proporção de 3:1. Varner et al. (1987) e Jasko et al. (1991), estudando o efeito do plasma seminal, notaram ser este, deletério ao espermatozóide, quando armazenado resfriado. Assim a centrifugação e retirada de 80% a 95% do plasma seminal, mantendo uma

concentração de 25×10^6 / mL, resulta num aumento da motilidade quando comparado ao sêmen com plasma seminal completo (Jasko, 1992ab).

Back et al. (1975), avaliaram o efeito de oito antibióticos onde alguns tinham bons resultados à temperatura de 5°C, como a estreptomicina, e outros à temperatura ambiente. Estudos mais recentes demonstraram que a combinação de penicilina potássica com amicacina promoveu a motilidade espermática. (Jasko et al., 1993). Assim, diluentes devem conter, rotineiramente, amicacina, ou a combinação de amicacina e penicilina potássica, ou ainda tircacilina como outro antibiótico de escolha em diluentes utilizados em garanhões com sensibilidade ao sulfato de amicacina.

2.10. A Inseminação Artificial e a Fêmea Eqüina

Segundo Edward (1994), a inseminação artificial é limitada em alguns países, como o Reino Unido, em que não se permite o registro de animais provenientes de IA, principalmente na raça PSI. Indiscutivelmente, são inúmeras as vantagens da implantação de um sistema de IA, onde sucintamente podemos citar a facilidade de se inseminar uma égua, o fracionamento do sêmen de um garanhão preservando-o reprodutivamente e à sua saúde, o aumento do número de éguas servidas por um garanhão em curto espaço de tempo, a facilidade do transporte do sêmen pelo mundo, difundindo-se material genético de qualidade, sem falar no exame constante que ocorre nos animais que estão em sistema de IA.

Algumas desvantagens podem ser atribuídas à IA, sendo as mais comuns a dificuldade de coletar determinados animais indóceis, a utilização de um manequim vivo e o risco de haver confusão no momento de inseminar uma determinada égua (Edward, 1994).

A fêmea eqüina é considerada poliéstrica sazonal, apresentando baixa atividade folicular na época de baixa luminosidade (outono e inverno), segundo Johnson & Becker (1988). O cio da égua é uma combinação de eventos fisiológicos que ocorrem entre duas fases, o estro e o diestro (Andrade, 1986), podendo também ser chamada folicular e luteal (Dieleman et al., 1986) intercalados por períodos de cio.

De acordo com Ginther (1992) a fase de estro se caracteriza normalmente pela presença de um folículo dominante acima de 30 mm de diâmetro no ovário de onde são secretados altos níveis de estrógeno pelas células da granulosa, podendo alcançar um diâmetro de 58 mm fisiologicamente em determinadas raças como a campolina, sendo o maior tamanho de um folículo alcançado 24 a 48 horas antes da ovulação, quando ocorre uma parada no crescimento folicular (Moura & Merket, 1996).

O término da manifestação dos sinais de cio caracteriza a fase de diestro ou luteal, ocorrendo entre 24 e 48 horas após a ovulação, com a conseqüente formação do corpo lúteo, ou corpo amarelo (Neely et al., 1989). Sirois et al. (1989) consideram a ovulação o início da fase luteal e a luteólise como a fase final do diestro, momento em que observaram níveis baixos de progesterona ($< 1 \text{ ng / mL}$).

Speirs (1999) relata que para se proceder a coleta de sêmen artificialmente, necessita-se do seguinte material mínimo: égua no cio como manequim, maneias de égua, vagina artificial, filtro de gel em série, termômetro com dial, bandagens para a cauda e lubrificante estéril. Para a inseminação recomenda ainda o uso de luvas plásticas para palpação, lubrificante estéril, pipeta adequada para égua, seringa estéril e sabões neutros para limpeza do períneo. Quanto mais próximo da ovulação a inseminação ocorrer, maiores as chances de prenhez (Edward, 1994).

Van der Holst (1984) relatam que o desconhecimento da fisiologia do ciclo estral da égua foi a maior causa de insucesso da IA nos Países Baixos, pois de 330 éguas inseminadas em propriedades particulares na Holanda, a taxa de nascimento foi de apenas 55%, enquanto as IA's realizadas em centrais especializadas resultaram em 74% de potros vivos. Da mesma forma, Rota et al. (2004) evidenciaram que, sob condições ideais de manejo, as taxas de prenhez são maiores. Os índices de prenhez de éguas submetidas a IA em centrais especializadas foram de 80,6% (n=31) enquanto as taxas sob condições de campo foram de 52% (n=25). Em geral, espera-se uma taxa de prenhez ao 1º ciclo $\geq 50\%$ quando a monta é natural (Voss, 1993). Jasko et al. (1992) relatam que taxas de gestação obtidas com sêmen refrigerado por 24 horas são semelhantes às obtidas com sêmen a fresco. Porém, quando este período excede 48 horas, uma redução de cerca de 50% pode ser verificada.

Como apresentado na Tabela 1, podemos observar alguns trabalhos relacionados à insminação artificial em equinos onde são mostrados vários resumos

com seus respectivos resultados. Três trabalhos especificamente são de bastante importância pois tratam exatamente de uma metodologia onde o sêmen foi estocado de 4 a 5°C por períodos de até 48 horas (Mattos, 1995; Zidane *et al.*, 1991; Nunes *et al.*, 2004) com as taxas de prenhez divulgadas. Vale ressaltar que os respectivos trabalhos utilizaram, como diluente de sêmen, o Kenney (1975) à base de leite desnatado e glicose.

Tabela 1 – Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado (adaptado de Nunes *et al.*, 2006).



Nunes *et al.* Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado.

Autor(es)	Método de preservação	Temperatura de estocagem	Tempo de estocagem	Concentração espermática	Volume da dose inseminante	Frequência das IA	Diluidor	Índice de eficiência reprodutiva
Jasko <i>et al.</i> (1992c)	Sêmen fresco	Ambiente	Até 60' pós-colheita	600 x 10 ⁶ totais	---	Dias alternados	Leite desnatado - Glicose	76% (n=41) Taxa de prenhez/ciclo
Klug (1992)	Sêmen fresco	Ambiente	---	---	---	---	Kenney <i>et al.</i> (1975) ou Glicina- gema Gema de ovo	67,1% Taxa de natalidade
Ferreira (1993)	Sêmen fresco	Ambiente (28-30°C)	Até 60' pós-colheita	250 x 10 ⁶ viáveis	---	Dias alternados	---	83% (n=29) Taxa de prenhez/ciclo
Mattos (1995)	Sêmen fresco	Ambiente	Até 60' pós-colheita	500 x 10 ⁶ totais	20 ml	Dias alternados	Leite desnatado sem glicose	75,7% (n=30) Taxa de prenhez/ciclo
Gahne <i>et al.</i> (1998)	Sêmen fresco	Ambiente	---	500 x 10 ⁶ viáveis	---	---	---	64% (n=32) Taxa de prenhez/ciclo
Gahne <i>et al.</i> (1998)	Sêmen fresco	Ambiente	---	300 x 10 ⁶ viáveis	---	---	---	75% (n=32) Taxa de prenhez/ciclo
Brandão <i>et al.</i> (2003)	Sêmen fresco	37°C	Até 60' pós-colheita	200 x 10 ⁶ viáveis	10 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	66,70% (n=30) Taxa de prenhez no 1º ciclo
Brandão <i>et al.</i> (2003)	Sêmen fresco	37°C	Até 60' pós-colheita	400 x 10 ⁶ viáveis	10 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	65,50% (n=29) Taxa de prenhez no 1º ciclo
Douglas-Hamilton <i>et al.</i> (1984)	Sêmen refrigerado	4°C	6-23 h	1,0 -1,5 x 10 ⁶ totais	---	1,6 IA por ciclo estral	Kenney <i>et al.</i> (1975)	65% (n=46) Taxa de prenhez no 1º ciclo
Heiskanen <i>et al.</i> (1987)	Sêmen refrigerado	5-7°C	24 h	---	---	---	Kenney <i>et al.</i> (1975)	82% (n=11) Taxa de prenhez no 1º ciclo
Heiskanen <i>et al.</i> (1987)	Sêmen refrigerado	5-7°C	24 h	---	---	---	Kenney <i>et al.</i> (1975) - Hepes e Teofilina	70% (n=10) Taxa de prenhez no 1º ciclo
Jasko <i>et al.</i> (1992c)	Sêmen refrigerado	4°C	24 horas	600 x 10 ⁶ totais	---	Dias alternados	Leite desnatado- Glicose	65% (n=83) Taxa de prenhez no 1º ciclo
Ferreira (1993)	Sêmen refrigerado	4-6°C	24 horas	250 x 10 ⁶ viáveis	---	Dias alternados	Gema de ovo	80% (n=30) Taxa de prenhez/ciclo
Ferreira (1993)	Sêmen refrigerado	4-6°C	48 horas	250 x 10 ⁶ viáveis	---	Dias alternados	Gema de ovo	76% (n=29) Taxa de prenhez/ciclo
Heiskanen <i>et al.</i> (1994)	Sêmen refrigerado	---	41±6 h	1,5 -2,0 x 10 ⁶ totais	40 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	87% (n=15) Taxa de prenhez no 1º ciclo
Heiskanen <i>et al.</i> (1994)	Sêmen refrigerado e centrifugado	---	41±6 h	1,5 -2,0 x 10 ⁶ totais	40 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	60% (n=15) Taxa de prenhez no 1º ciclo
Mattos (1995)	Sêmen refrigerado	4°C	24 h	500 x 10 ⁶ totais	20 ml	Dias alternados	Leite desnatado sem glicose	58,6% (n=29) Taxa de prenhez/ciclo
Valle <i>et al.</i> (1998)	Sêmen refrigerado	14°C	215 minutos	400 x 10 ⁶ viáveis	15 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	56% (n=100) Taxa de prenhez/ciclo
Zidane <i>et al.</i> (1991)	Sêmen refrigerado	5°C	48 h	500 x 10 ⁶ viáveis	20 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	40,5% (n=37) Taxa de recuperação embrionária
Zidane <i>et al.</i> (1991)	Sêmen refrigerado	20°C	48 h	500 x 10 ⁶ viáveis	20 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	14,3% (n=14) Taxa de recuperação embrionária
Nunes <i>et al.</i> (2004a)	Sêmen refrigerado	15-20°C	24 h	300 x 10 ⁶ viáveis	40 ml	Única - com indução OV*	Kenney <i>et al.</i> (1975)	71,42% (n=35) Taxa de prenhez no 1º ciclo

3. JUSTIFICATIVA

Este trabalho se justifica por vários motivos, dentre eles o fato da inseminação artificial ter aspectos positivos no processo de melhoramento genético, tais como diminuição dos custos com transporte e hospedagem dos animais, diminuição dos riscos de aquisição de doenças, acidentes e estresse, principalmente se estes tiverem suas crias ao pé.

Outro fator é a utilização água de coco como diluente de sêmen eqüino, sendo uma alternativa biológica vegetal para conservação de germoplasma, como demonstrado em trabalhos anteriores em outras espécies animais, fugindo dos padrões dos diluentes convencionais, minimizando alguns possíveis efeitos tóxicos de certos componentes provenientes de produtos de origem animal, tais como a lactenina tipo 3, uma proteína de baixo peso molecular presente no leite *in natura* (Evans & Maxwell, 1987).

Além disso, não existem trabalhos sobre o uso deste diluente *in vivo* na espécie eqüina sendo, portanto, uma fonte imensa para outros trabalhos.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Estudar a viabilidade do diluente à base de água de coco em pó (ACP-105) na preservação do sêmen eqüino resfriado a 5°C.

4.2. ESPECÍFICOS

- Comparar os efeitos dos diluentes ACP-105 e Equimix[®] sobre a sobrevivência de espermatozóides eqüinos *in vitro* resfriados a 5°C conservados por 2, 24, 36, 48 e 72 horas.
- Avaliar o efeito do diluente ACP-105 sobre a fertilidade de éguas inseminadas artificialmente com o sêmen resfriado a 5°C conservado por um período entre 24 e 36 horas.

5. CAPÍTULO ÚNICO

INTRODUÇÃO

A refrigeração e o transporte do sêmen eqüino são práticas rotineiras nos principais criatórios de cavalos. A utilização de sêmen resfriado teve grande progresso nos últimos anos, principalmente após a liberação da biotecnologia pela maioria das associações de criadores, sendo a refrigeração uma alternativa de difusão de material genético para os garanhões que não respondem bem ao congelamento.

Segundo Papa et al. (2005), o Brasil é o segundo país que mais utiliza o sêmen refrigerado, assim, o desenvolvimento dessa técnica vai possibilitar o melhor aproveitamento dos animais de grande potencial genético.

A utilização do sêmen resfriado tem algumas vantagens, tais como a economia financeira proporcionada ao proprietário, uma vez que o custo do envio de uma dose de sêmen é bem menor que o envio do animal, sem falar na possibilidade de acidentes e nos gastos com hospedagens; quanto ao bem estar animal, reduz-se o estresse da égua nos transportes e se houver potros, o risco de acidentes graves. Do ponto de vista sanitário, diminui-se sensivelmente o risco de transmissão de doenças sexuais, ou ocasionadas por exposição à patógenos estranhos ao animal (Brinsko & Varner, 1992).

Sabe-se que a água de coco tem sido utilizada para a conservação (resfriamento e criopreservação) de sêmen de animais domésticos. Entretanto, até o momento, não se tem o domínio de protocolos de conservação do sêmen, os quais utilizam a água de coco como diluente do plasma seminal eqüino. No que concerne ao aspecto prático, ele poderá permitir a disponibilidade da água de coco como diluente de sêmen em centros de pesquisa que não disponham da matéria-prima (coco), e que visem a sua utilização em programas de conservação de células germinais pela facilidade de aquisição e necessitar de menor nível técnico para o processamento e armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas fases, uma *in vitro* comparando a viabilidade do sêmen eqüino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-105; ACP Biotecnologia) ou em diluente comercial Equimix[®], e a outra *in vivo* avaliando-se o índice de prenhez através da inseminação artificial de éguas.

Local de realização do experimento

Ambas as fases do experimento foram realizadas no Haras do Peixe, com laboratório próprio, situado à rodovia DF-130, Km 21, Núcleo Rural Chapadas dos Guimarães, chácara 03, Brasília/DF, com 15°46'47" de latitude sul e 47°55'47" de longitude oeste, durante os meses de janeiro a dezembro de 2007.

FASE 1: Estudo *in vitro* da viabilidade do sêmen eqüino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-105) ou Equimix

Exame de aptidão reprodutiva

O exame de aptidão reprodutiva dos machos incluiu uma avaliação minuciosa da genitália externa e interna dos animais, sendo anotadas todas as variações, desde pequenas alterações testiculares, consideradas sem significado patológico, até alterações grosseiras, como malformações gonadais e lesões inflamatórias.

As coletas de amostras de sêmen entravam na seqüência do exame para detectar quaisquer problemas maiores, tais como azoospermia ou necrospermia. As variáveis empregadas como indicadores da qualidade do sêmen foram a motilidade, o vigor, a libido e a concentração dos espermatozóides. Os indivíduos que não se enquadraram dentro dos padrões foram descartados, sendo considerados inaptos para o experimento.

Colheita das amostras de sêmen

Foram utilizados 05 garanhões das raças Campolina (02), Árabe (01) e Mangalarga Marchador (02). Foram coletados 05 ejaculados de cada, totalizando 25 amostras. Os garanhões apresentavam idades variando de 36 a 120 meses, eram registrados no MAPA, e mantidos sob regime alimentar e de estabulação semelhantes.

Todas as colheitas destinadas ao experimento foram realizadas após esgotamento dos animais sete dias antes, através de vagina artificial modelo Botucatu (Papa & Alvarenga, 1987), com auxílio de uma égua em estro.

Análises pós-colheita

Imediatamente após a colheita o sêmen foi avaliado macro e microscopicamente (Amann & Hammerstedt, 1993) e os resultados anotados em fichas individuais. O sêmen foi classificado de acordo com os padrões do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Assim, foram aproveitadas apenas amostras que apresentavam as seguintes características: motilidade total inicial maior que 50% (0% a 100%), vigor 2 (0 a 5) e máximo de 50% de patologia espermática.

O volume foi mensurado em becker ou em proveta graduada após a separação da fração gelatinosa. A motilidade total foi avaliada subjetivamente em microscópio óptico, em aumento de 200x, onde foi depositada uma gota de sêmen em uma lâmina a 38°C e coberta posteriormente com lamínula, com os valores expressos em percentual (Amann & Hammerstedt, 1993). O vigor foi analisado de acordo com o movimento dos espermatozoides com auxílio de lâmina pré-aquecida a 38°C e coberta com lamínula. A concentração foi determinada através da contagem em câmara hematocimétrica (Neubauer) e microscópio óptico, sob aumento de 200x, na diluição prévia de 1:20 (sêmen:água destilada, respectivamente) com valores expressos em milhões de espermatozoides por mL ($\times 10^6/\text{mL}$).

Em seguida, o sêmen foi submetido à centrifugação a 1.500 r.p.m. por 11 minutos (Keller, 2001), retirado o sobrenadante (Raphael, 2007) e diluído em ACP-105 (ACP) e Equimix® (EMX) até atingirem a concentração de 30×10^6 sptz/mL. O ACP-105 foi diluído em 100 mL de água destilada e adicionando de 100 mg de amicacina.

Na primeira fase do experimento (*in vitro*), as amostras foram divididas em 02 alíquotas, uma para cada diluente, e alocadas em 10 tubos de Eppendorf, 05 para cada diluente, e estocados a 5°C.

Refrigeração do sêmen

As amostras de cada tratamento (“ACP” e “EMX”) da primeira fase foram acondicionadas em tubos de Eppendorf e submetidas à refrigeração a 5°C, realizada

em *Eqüitainer* I (Hamilton-Thorn Research), depositado na sombra, dentro do laboratório, a temperatura ambiente, de acordo com Douglas-Hamilton (1984).

As amostras foram retiradas nos tempos de 2, 12, 24, 36 e 48 horas para análise individual e comparativa (Cotorello & Henry, 2002).

Análise do sêmen pós-refrigeração

Foram efetuadas análises nos tempos 2, 12, 24, 36 e 48 horas pós-refrigeração para os dois diluentes, constituindo-se nos tratamentos ACP2, ACP12, ACP24, ACP36, ACP48, EMX2, EMX12, EMX24, EMX36 e EMX48, respectivamente; onde as amostras foram retiradas do dispositivo de refrigeração, aquecidas em banho-maria à 37°C e posteriormente avaliadas quanto à motilidade total e vigor, através de microscópio óptico com platina aquecida, segundo as técnicas descritas anteriormente. A Figura 1 apresenta o diagrama do experimento na primeira fase.

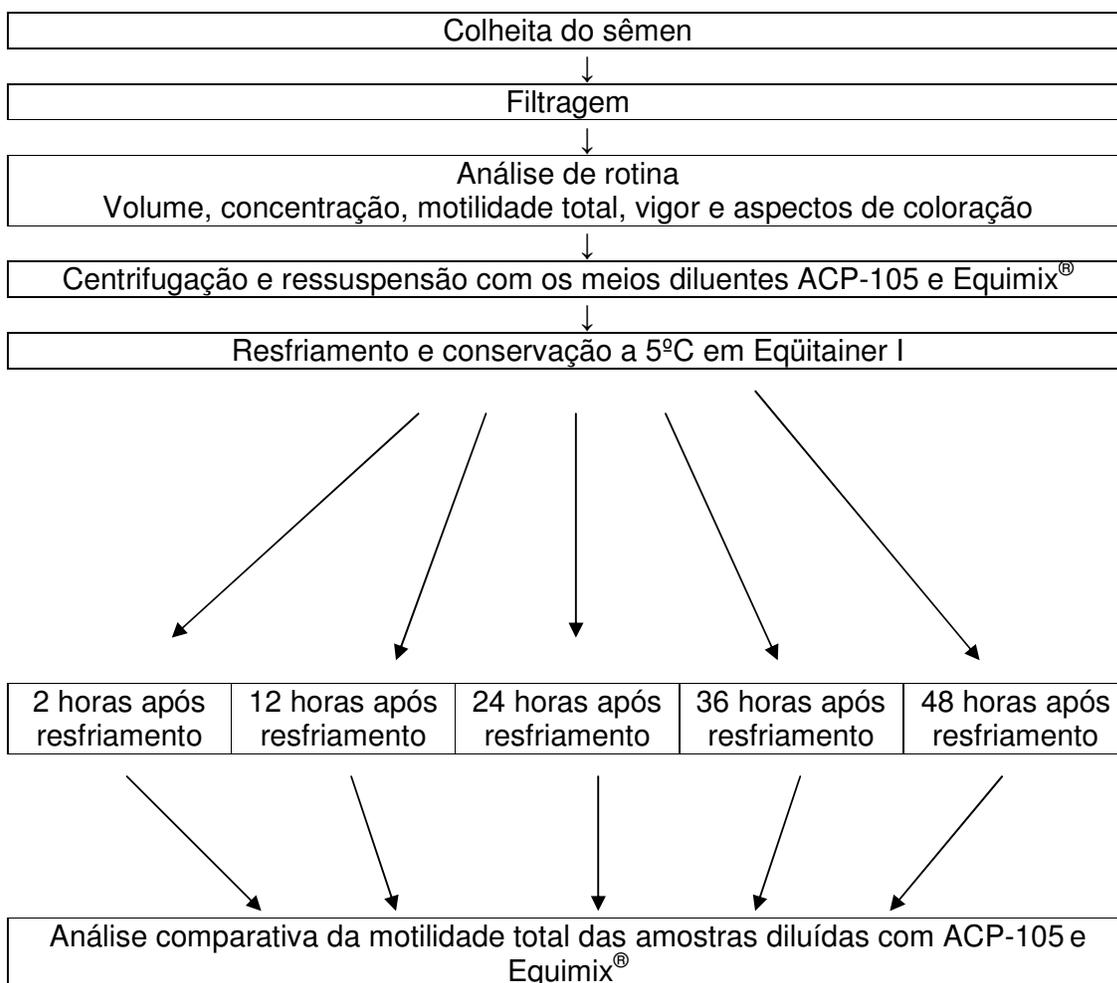


Figura 1 – Diagrama ilustrativo da primeira fase do experimento.

FASE 2: Estudo *in vivo* da viabilidade do sêmen eqüino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-105) através da inseminação artificial de éguas

Exame de aptidão reprodutiva

Para essa fase, 18 éguas foram avaliadas, principalmente em suas características reprodutivas. A genitália externa foi avaliada quanto a lesões, malformações e inflamações locais, descartando-se aquelas que apresentaram qualquer problema e em qualquer grau (Edward, 1994).

Das 18 éguas apresentadas, apenas 07 estavam aptas a participar do experimento e todas elas já haviam gestado pelo menos uma vez, cuja gestação e parto transcorreram sem problema algum. Estavam com ciclo estral normal e apresentavam-se em bom estado nutricional, com escore corporal mínimo 3 (0 a 5).

Colheita das amostras de sêmen

Foram utilizados os dois garanhões que tiveram melhor desempenho durante a primeira fase (garanhões 3 e 4). Os mesmos foram coletados semanalmente, sincronizados com o desenvolvimento folicular das éguas, para que o resfriamento e a inseminação pudessem ocorrer em tempo satisfatório (Moura & Merkt, 1996).

Análises pós-colheita

O sêmen foi analisado e centrifugado da mesma maneira que na fase 1. Em seguida, o sêmen foi diluído em ACP-105 (ACP) até atingir a concentração de 60×10^6 spz/mL e armazenado em sacos de polietileno estéreis (Raphael, 2007).

Refrigeração do sêmen

As amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno estéreis (Raphael, 2007) e resfriadas também em equitainer, da mesma forma que na fase 1, retiradas apenas 24 ou 36 horas após o início da refrigeração, dependendo do momento requerido para o experimento.

Inseminação artificial

As éguas foram induzidas a entrarem no cio com doses intramusculares de cloprostenol sódico (0,26 mg/animal) quando, a partir do quinto dia pós-indução, iniciava-se o controle folicular para prever o momento da ovulação, segundo as

características de evolução folicular sugeridas por McKinnon & Voss (1993) e Moura & Merkt, (1996). A colheita do sêmen foi realizada nos moldes descritos anteriormente, no 6º ou 7º dia pós-indução das éguas, de acordo com o tempo requerido para resfriamento e posterior inseminação com 36 ou 24 horas, respectivamente, pós-resfriamento.

Neste experimento, a inseminação foi realizada com dose de sêmen de aproximadamente 400×10^6 de espermatozoides móveis, depositada no fundo do corno uterino com auxílio de uma pipeta flexível com metodologia similar à preconizada por Rigby et al. (2000).

Quando o sêmen diluído com o ACP-105 atingiu 12 horas de estocagem, as éguas foram examinadas por ultra-sonografia e estas foram agrupadas seguindo a sincronia ovulatória de acordo com crescimento folicular compatível (McKinnon & Voss, 1993; Moura & Merkt, 1996). As inseminações foram realizadas às 12 ou 24 horas após a indução da ovulação com hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana, 2.500 UI /fêmea IV) quando o folículo atingisse 35 mm de diâmetro (Edward, 1994) de acordo com o tratamento. Foram monitorados um total de 45 ciclos estrais. A partir daí, as éguas foram examinadas a cada 6 horas para certificação da ovulação.

As inseminações foram realizadas de modo que todas as éguas foram induzidas e reinduzidas e todas elas receberam sêmen com 24 e 36 horas de estocagem em momentos distintos, de acordo com o crescimento folicular pré-examinado de cada ciclo estral, buscando se eliminar o efeito alternativo da variável égua. Assim pôde-se avaliar o resultado de acordo com o tempo de estocagem do diluente e não de acordo com a égua.

Quinze dias após a ovulação, foi realizado o diagnóstico de prenhez por ultra-sonografia trans-retal (ultra-som portátil modelo Pie Medical 480vet, com transdutor linear 5/7,5 MHz), onde se visualizava, ou não, a vesícula embrionária de aproximadamente 14 a 18mm de diâmetro (Allen, 2000); após o diagnóstico de prenhez as éguas foram reinduzidas com o cloprostenol sódico (0,26 mg/animal) para uma nova inseminação. Os dados foram anotados em fichas individuais onde cada égua foi inseminada em quatro ciclos estrais distintos, totalizando 28 observações. O diagrama ilustrativo da segunda fase encontra-se a seguir, na Figura 2.

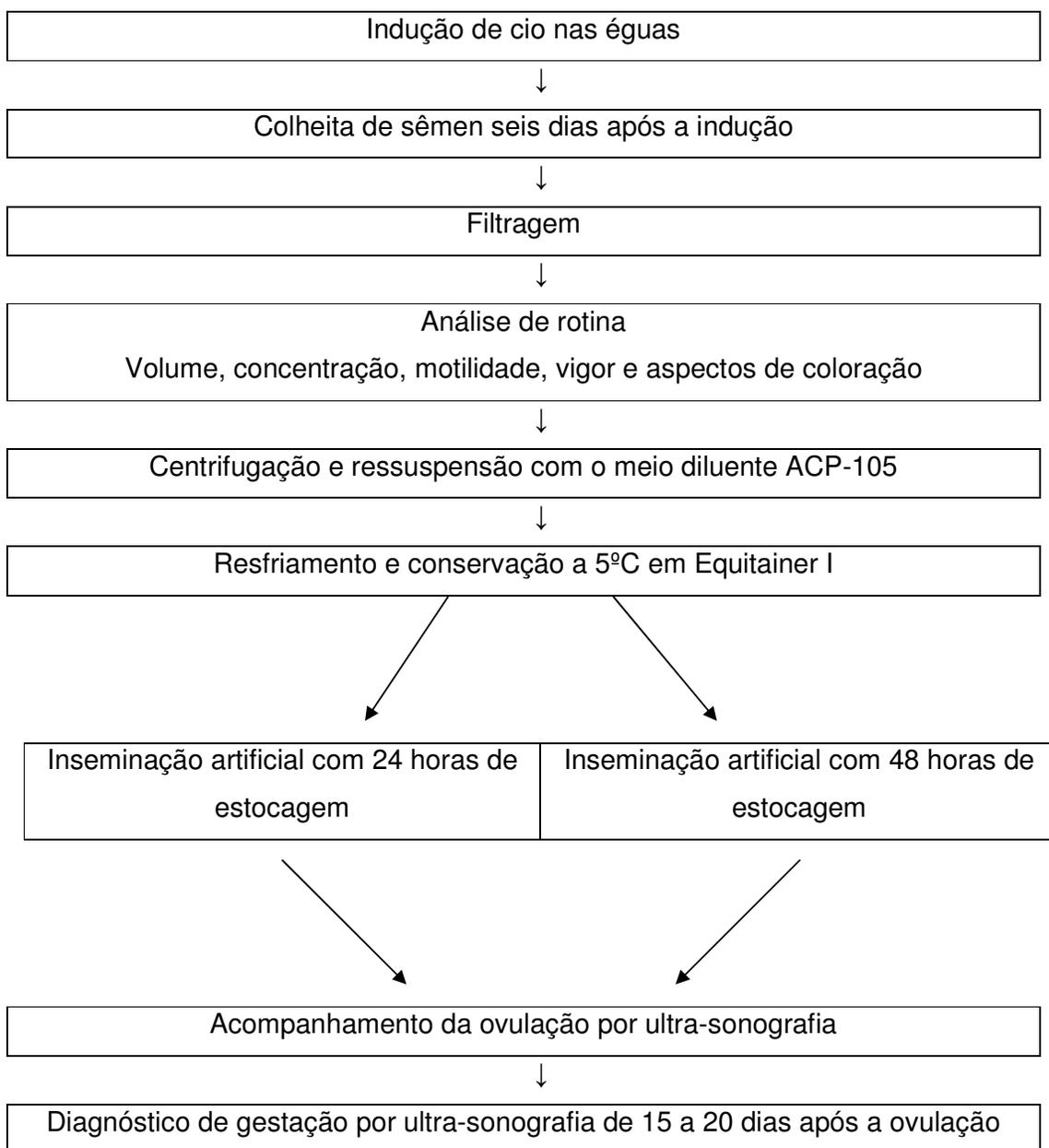


Figura 2 – Diagrama ilustrativo da segunda fase do experimento.

Análises estatísticas

Foi utilizado o programa estatístico SAS[®], onde foram analisadas as variáveis do experimento descritivamente sendo suas médias submetidas à análise de variância ao nível de 5% de probabilidade. Foi empregado também o teste de TUKEY para se avaliar e comparar as médias de motilidade total dos garanhões estudados através dos diluentes utilizados. As correlações de Pearson também foram empregadas para algumas características tais como tempo de preservação e manutenção da motilidade. Para as análises dos diluentes estudados, utilizou-se a curva de regressão para saber o comportamento da motilidade espermática nos tempos determinados de acordo com as observações encontradas.

RESULTADO E DISCUSSÃO

FASE 1: Estudo *in vitro* da viabilidade do sêmen eqüino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-105) ou Equimix

O sêmen dos garanhões avaliados na primeira fase do experimento apresentou os seguintes valores médios a fresco: volume $103,08 \pm 20,55$ mL; motilidade total $86,88 \pm 5,48\%$; concentração $65,37 \pm 10,52 \times 10^6$ /mL; vigor $3,79 \pm 0,65$. Esses valores médios apresentados estão de acordo com os observados por Sobreira Neto, 2008 (dados não publicados) que encontrou volume $86,5 \pm 22,6$ mL; motilidade total $88,56 \pm 11,5\%$; concentração $68,48 \pm 9,59 \times 10^6$ /mL; vigor $3,85 \pm 0,55$, com os relatados por Amann & Hammerstedt (1993) que encontraram valores semelhantes em seus estudos, e pelo CBRA (1998) que preconiza volume mínimo de 25 mL (sem a fração do gel), motilidade espermática acima de 50%, vigor mínimo de 2 (numa escala de 1 a 5) e concentração espermática mínima de 20×10^6 /mL.

Os valores médios encontrados para motilidade total do sêmen diluído em ACP-105 e Equimix[®] e refrigerado a 5°C estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Média e desvio padrão da motilidade total (%) do sêmen eqüino diluído em ACP-105 e Equimix[®], refrigerado e conservado a 5°C por até 48 horas

Tratamento	Garanhão 1	Garanhão 2	Garanhão 3	Garanhão 4	Garanhão 5	Média
Fresco	$88,0 \pm 5,70^a$	$82,0 \pm 8,36^a$	$89,0 \pm 5,47^a$	$91,0 \pm 6,52^a$	$86,0 \pm 8,21^a$	$87,2 \pm 3,42$
ACP 2	$71,0 \pm 6,52^a$	$83,0 \pm 2,74^a$	$81,0 \pm 6,52^a$	$87,0 \pm 4,47^a$	$82,0 \pm 7,58^a$	$80,8 \pm 5,93$
EMX 2	$73,0 \pm 4,47^a$	$81,0 \pm 5,48^a$	$82,6 \pm 2,52^a$	$88,0 \pm 2,74^a$	$78,0 \pm 7,58^a$	$80,5 \pm 5,55$
ACP 12	$60,0 \pm 8,94^a$	$74,0 \pm 8,94^a$	$78,0 \pm 5,7^a$	$78,0 \pm 4,47^a$	$76,0 \pm 6,52^a$	$73,2 \pm 7,56$
EMX 12	$63,0 \pm 8,37^a$	$67,0 \pm 11,52^a$	$67,5 \pm 2,52^a$	$72,0 \pm 2,74^a$	$72,0 \pm 4,47^a$	$68,3 \pm 3,80$
ACP 24	$55,0 \pm 5,00^a$	$62,0 \pm 9,08^a$	$74,0 \pm 4,18^a$	$70,0 \pm 3,52^a$	$68,0 \pm 7,58^a$	$65,8 \pm 7,42$
EMX 24	$49,0 \pm 4,18^a$	$43,0 \pm 2,74^a$	$41,3 \pm 2,16^a$	$53,0 \pm 7,58^a$	$61,0 \pm 9,61^a$	$49,5 \pm 7,97$
ACP 36	$39,0 \pm 2,24^a$	$28,0 \pm 2,74^a$	$50,0 \pm 3,53^a$	$41,0 \pm 4,18^a$	$35,0 \pm 5,02^b$	$38,6 \pm 8,08$
EMX 36	$36,0 \pm 6,52^a$	$32,0 \pm 7,58^a$	$22,5 \pm 2,89^b$	$44,0 \pm 2,24^a$	$44,0 \pm 4,18^a$	$35,7 \pm 9,02$
ACP 48	$6,0 \pm 2,52^b$	$7,0 \pm 1,45^b$	$5,5 \pm 2,55^b$	$6,8 \pm 1,78^b$	$4,3 \pm 3,57^b$	$5,92 \pm 1,09$
EMX 48	$23,0 \pm 2,74^a$	$21,4 \pm 8,79^a$	$14,8 \pm 7,95^a$	$19,0 \pm 2,24^a$	$21,4 \pm 8,79^a$	$19,9 \pm 3,19$

Letras minúsculas diferentes entre linhas dentro de um mesmo tempo de conservação ($p < 0,05$).
ACP = ACP-105; EMX = Equimix; 2, 12, 24, 36 e 48 = horas de conservação a 5°C.

De acordo com a análise de variância, a um nível de significação a 5%, fizemos o contraste entre todos os ganhões para tentar descartar a hipótese inicial (H_0 - de não haver diferença significativa entre as observações). Conforme os resultados obtidos, não foram observados efeitos dos ganhões no estudo, o mesmo resultado esperado quando se compara o ejaculado de um mesmo ganhão, ou seja, não havendo diferença significativa entre essas observações (aceitando H_0) com uma certeza de 95% ($p < 0,05$).

Esta observação foi feita primeiramente para verificar a uniformidade dos animais escolhidos, onde foi observada uma unidade comportamental e uma capacidade reprodutiva semelhante dos animais empregados no experimento nos momentos após diluição. Estes resultados estão de acordo com o observado por Keller et al. (2001), que trabalhou com um lote de animais uniformes em todo o seu experimento.

Quanto aos diluentes estudados (ACP-105 e o Equimix[®]), também não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as amostras nos tempos de observação determinados (2, 12, 24 e 36 horas), conforme apresentado na Tabela 2, revelando uma ligeira semelhança de resultados *in vitro* entre o ACP-105 e o Equimix[®], valores semelhantes ao encontrado por Raphael (2007) que testou quatro ganhões nos tempos 2, 12 e 24 horas e não notou diferença significativa entre os animais, trabalhando com centrifugação e Goulart (2004), que testou nos tempos 12, 24 e 48 horas de resfriamento e também não observou diferença significativa nas amostras diluídas com diluentes à base de leite desnatado.

Notamos que, entre 36 e 48 horas de conservação, a hipótese H_0 foi rejeitada, pois houve uma queda acentuada da motilidade total, principalmente, na amostra diluída com o ACP-105 em todos os ganhões, demonstrando uma diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$) entre os diluentes (ACP-105 e o Equimix[®]), quando o diluente Equimix[®] apresentou uma vantagem na média da motilidade total, quando aplicado o teste de Tukey a um nível de significância 5%. Todos os valores para o sêmen diluído com o ACP-105 após 48 horas de conservação ficaram abaixo de 10% de motilidade total (Tabela 2), sendo considerado completamente inviável pelos padrões reprodutivos apresentados (CBRA, 1998), que apresenta valores mínimos para um sêmen de qualidade acima de 25% de motilidade progressiva. Este fato surpreendeu quando comparado com os resultados obtidos por Douglas-

Hamilton (1984), que demonstrou valores expressivos (> 30% de motilidade total) acima de 48 horas de estocagem.

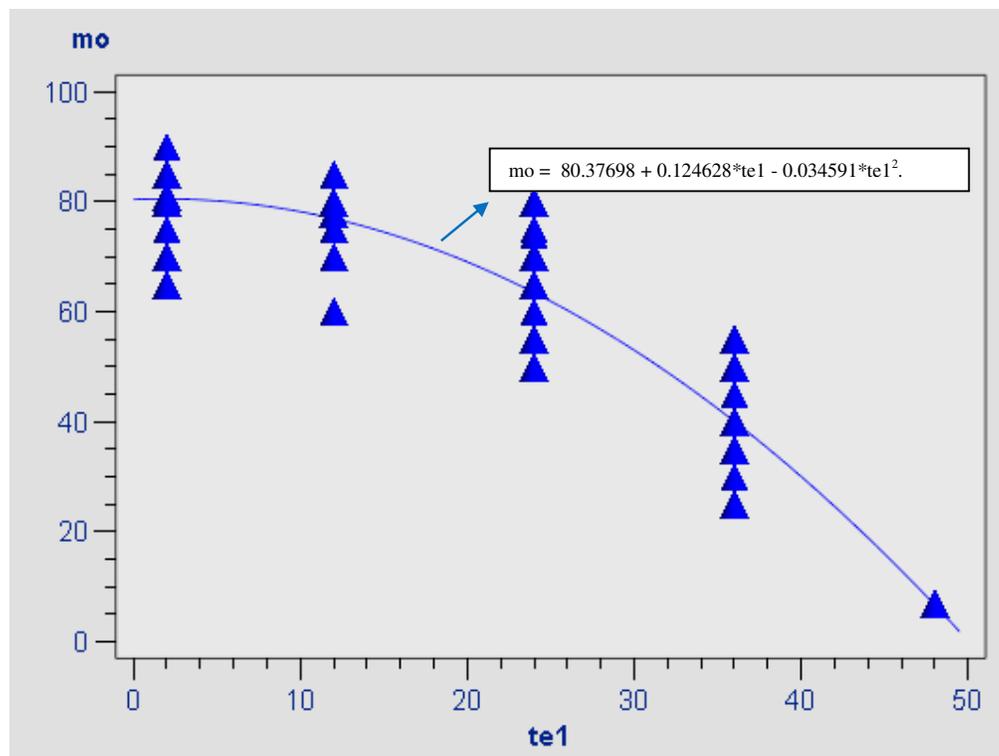


Gráfico 1. Curva de motilidade, com a respectiva equação de regressão, do diluente ACP-105 ao longo dos tempos 2, 24, 36 e 48 horas de resfriamento e estocagem a 5°C

No Gráfico 1, a curva de regressão demonstra o comportamento da motilidade dos espermatozoides nos cinco tempos de observação. Notamos que a curva forma uma parábola com uma convexidade indicando que os espermatozoides ficam móveis em maior número por mais tempo, diferente do observado no Gráfico 2, que demonstra a curva de regressão para o diluente Equimix[®] nos mesmos períodos de tempo. Este último gráfico mostra exatamente uma curva de regressão formando uma concavidade, onde observamos que os espermatozoides, nos primeiros momentos (até 36 horas), tem uma queda mais drástica na motilidade, porém com 48 horas de preservação, apresentam um melhor desempenho, como dito anteriormente.

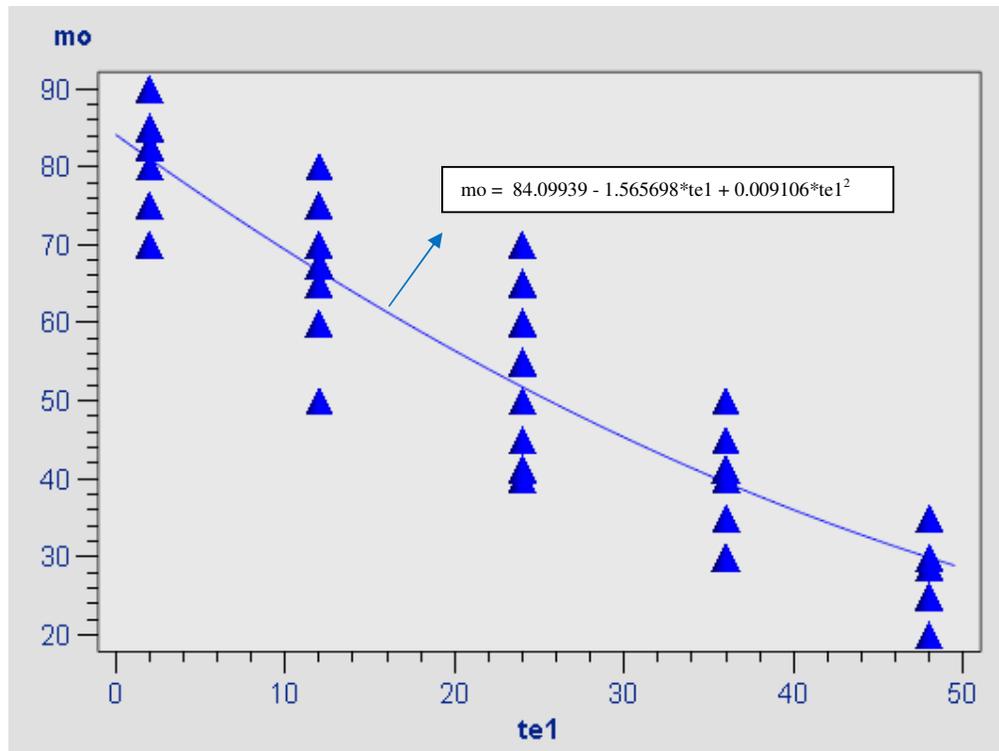


Gráfico 2. Curva de motilidade, com a respectiva equação de regressão, do diluente Equimix[®] ao longo dos tempos 2, 24, 36 e 48 horas de resfriamento e estocagem a 5°C

FASE 2: Estudo *in vivo* da viabilidade do sêmen eqüino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-105) através da inseminação artificial de éguas

Por não haver um estudo e nem um protocolo definido *in vivo* para o diluente ACP-105, precisávamos de dados que nos levasse a crer que este diluente seria uma boa alternativa para conservação do sêmen na espécie eqüina.

Sendo assim, na segunda fase do experimento, as éguas foram divididas em dois grupos (ACP24 e ACP36) e inseminadas com sêmen diluído com ACP-105 refrigerado e armazenado a 5°C por 24 e 36 horas, com o aplicação de 2.500UI de hCG intravenosa (para que tivéssemos certeza da ovulação) a partir de um folículo com diâmetro maior que 35mm e a posterior ovulação sendo monitorada por ultrasonografia, metodologia esta de acordo com Farinasso (2004) e McCue et al. (2004), que utilizaram a mesma substância, observaram um percentual de 59,9% de éguas ovulando entre 24 e 48 horas após a indução da ovulação.

Para o sêmen estocado por 24 horas, obtivemos um índice de prenhez de 57,1%, ou seja, das quatorze inseminações utilizando-se o sêmen dos dois garanhões (Tab. 2) em momentos distintos, este índice encontrado revelou um resultado próximo aos observados por Douglas-Hamilton et al. (1984), que trabalharam com lote de 46 éguas inseminando artificialmente com sêmen estocado a 4°C. A inseminação foi realizada com uma dose no fundo do corno uterino com auxílio de uma pipeta flexível, metodologia esta similar à preconizada por Rigby et al. (2000), que obtiveram 80% de espermatozóides remanescentes no oviduto comparado com 50% quando a inseminação foi feita no corpo do útero. Segundo este autor, pode-se utilizar baixas doses, se necessário, de espermatozóides móveis, quando o sêmen é depositado neste local descrito anteriormente.

Já com o sêmen armazenado por 36 horas, houve um desempenho a desejar, quando comparado com os resultados obtidos por Jasko et al. (1992a) e o padrão reprodutivo atual, seguindo a mesma metodologia de inseminação descrita por Rigby et al. (2000), que fizeram a deposição do sêmen no fundo do corno uterino respectivo à ovulação. Obtivemos um índice de prenhes de apenas 35,7% (Tabela 2), resultado este incompatível com as modernas técnicas empregadas na reprodução eqüina, que têm resultados de índice de prenhez nestas condições, um pouco mais expressivos; porém quando analisado do ponto de vista científico, são bastante satisfatórios, pois o primeiro trabalho fora realizado apenas *in vitro*, onde avaliou-se o sêmen até 6 horas de resfriamento. O presente trabalho é apenas o segundo experimento com água de coco como diluente de sêmen eqüino, necessitando de mais pesquisas para se tentar aumentar o tempo de estocagem e obter resultados semelhantes aos diluentes existentes no mercado, já bastante estudados, pesquisados e melhorados.

Tabela 3. Taxa de prenhez de éguas inseminadas artificialmente com sêmen dos garanhões 3 e 4 diluído em ACP-105 com 24 (ACP24) e 36 (ACP36) horas de conservação a 5°C

	ACP24	ACP36
Garanhão 3	71,43% (05 ^a /07)	42,86% (03 ^a /07)
Garanhão 4	42,86% (03 ^a /07)	28,57% (02 ^a /07)
TOTAL	57,14% (08 ^A /14)	35,71% (05 ^B /14)

Valores entre parênteses referentes ao número de éguas prenhez sobre o número de éguas inseminadas.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha (p<0,05).

Nota-se nos resultados apresentados na Tabela 3 que o tempo de estocagem foi um fator limitante para a sobrevivência e viabilidade dos espermatozóides ocorrendo uma correlação negativa entre o aumento do tempo de resfriamento e a qualidade do sêmen, visto no índice de prenhez decrescente, fato este observado por Goulart (2002).

O potencial de fecundação *in vivo* do espermatozóide é manifestado pela habilidade de percorrer o trato reprodutivo da fêmea, capacitar-se, se ligar à zona pelúcida, sofrer a reação acrossomal e penetrar no óvulo participando do desenvolvimento embrionário (Allen, 2000). Para isso deve transportar seus componentes químicos e biológicos bem protegidos pela membrana para que possam exercer com eficiência as suas funções.

Contudo, esta capacidade fecundante, bem como a motilidade, geralmente podem ser prejudicadas pelo estresse térmico, principalmente quando o sêmen é resfriado, ou congelado, afetando o comportamento e a distribuição dos componentes lipoprotéicos, podendo afetar a capacidade permeável da membrana (Parks, 1997; Graham, 1996). Para os valores apresentados neste estudo, notamos uma viabilidade do sêmen diluído com o ACP-105 no intervalo de tempo compreendido entre 12 e 24 horas de resfriamento, uma vez que os dispositivos de armazenamento fabricados no país (Max-Semen Express[®] e o Botu-Box[®]), segundo Raphael (2007), têm um período máximo de resfriamento de 24 horas, porém a uma temperatura de 15°C. A conservação da viabilidade espermática por pelo menos 24 horas é importante, pois este é, na maioria das vezes, o tempo necessário para que as amostras de sêmen dos garanhões sejam transportadas e recebidas pelos haras para a sua utilização na IA (Squires *et al.*, 1999). O armazenamento por períodos superiores pode desencadear processos bioquímicos que comprometem a fertilidade dos gametas, como a capacitação espermática prematura que resultará na diminuição da capacidade de penetrar e fertilizar o ovócito (Pommer *et al.*, 2002). Segundo Papa *et al.* (2005) a grande maioria das inseminações artificiais realizados no país, ocorrem num período de 2 a 12 horas de intervalo entre a coleta do sêmen e a inseminação artificial (Papa *et al.*, 2005), intervalo este em que o ACP-105 funciona muito bem acima da média, como discutido na comparação dos Gráficos 1 e 2.

A título de informação, está apresentado na Tabela 4, o comparativo entre o custo e o benefício sobre a utilização do ACP-105 e o Equimix[®], com valores em

reais atualizados em 22 de fevereiro de 2008, onde se comparou a viabilidade econômica de cada diluente.

Tabela 4. Custo e benefício comparativo entre os diluentes ACP-105 e Equimix[®]

	ACP-105	Equimix[®]
Preço por 100 mL	R\$ 0,50 ^{PP}	R\$ 9,95 ^P

^P = preço cotado pela Nutricell Nutrientes Celulares em 22 de fevereiro de 2008.

^{PP} = preço cotado pela ACP Biotecnologia em 22 de fevereiro de 2008.

Como se pode observar na Tabela 4, o diluente ACP-105 custa aproximadamente 5% do valor do outro diluente encontrado no mercado, sendo uma alternativa com um custo muito mais em conta para os trabalhos em nível de campo com enorme benefício econômico. Vale ressaltar que o preço informado pela empresa ACP Biotecnologia refere-se ao custo de produção, pois o mesmo ainda não se encontra disponível no mercado, estando ainda em fase de teste, porém podemos considerá-lo como uma alternativa futura.

Se fizermos uma projeção de custos para aproximadamente 12.500 inseminações artificiais durante uma estação de monta no país, com uma taxa de coleta/éguas servidas de 1/1.65, teríamos em torno de 7.500 coletas anuais. Com esses dados podemos estimar uma economia aproximada de R\$ 71.575,00 por ano hípico.

Sendo assim, além de mostrar um desempenho melhor, quando testado *in vitro*, apresentando uma curva de regressão melhor (Gráficos 1 e 2) que o diluente concorrente e um resultado satisfatório *in vivo* entre 24 e 36 horas de conservação, o ACP-105 se mostra também como uma alternativa lucrativa para os veterinários que trabalham a campo por apresentar uma taxa de prenhez semelhante aos encontrados em outros estudos, como mostra o Tabela 01 (Mattos, 1995; Nunes *et al.*, 2004), que utilizaram o diluente de sêmen Kenney (1975) à base de glicose e leite desnatado, provando uma semelhança nos resultados encontrados quando optamos pelo uso do ACP-105 como diluente de sêmen eqüino.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

A estocagem do sêmen resfriado de eqüinos, nestas condições, é estável até 36 horas, possível de proporcionar prenhez em índices em torno de 35%.

O sêmen eqüino diluído com água de coco em pó mostra-se viável nas mesmas condições que os diluentes já existentes no mercado, principalmente entre 24 e 36 horas de armazenamento, momento este máximo, período esse suficiente para permitir que seja transportado nas condições brasileiras.

A utilização do diluente ACP-105 com um tempo de estocagem entre 24 e 36 horas a 5°C apresentou uma relação custo-benefício superior ao diluente comparado, uma vez que os resultados foram semelhantes tanto *in vitro* como *in vivo*.

Contudo vale ressaltar a necessidade de mais estudos com a água de coco em pó como diluente de sêmen, no sentido de se buscar um incremento no tempo de estocagem utilizando-se equipamentos mais confiáveis no controle da temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. **Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ALLEN, W.R. The physiology of early pregnancy in the mare. Reprinted in the IVIS website with the permission of AAEP. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, **Proceedings...** 2000.

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effects of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa, **Animal Reproduction Science**, p.321-337, 2005.

ALMEIDA, J.L. **Efeitos de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de sêmen eqüino**. Brasília, 2006. 77p. Dissertação (Mestrado da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – UnB, 2006).

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation on stallion spermatozoa, **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal fonction. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v.14, p.397-406, 1993.

ANDRADE, L. S. O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. In: **Fisiologia e Manejo da Reprodução Eqüina**, 2 ed. Recife, p.57-63, 1986.

ARAÚJO, I.S. **Utilização da água de coco e do leite glicosado como diluidor do sêmen ovino**. Fortaleza, 1990. 35p. Monografia (Especialização em Produção e

Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1990).

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

AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791-797, 1996.

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

BACK, D.G.; PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; SEIDEL, G.E. Effect of antibacterial agents on the motility of stallion spermatozoa at various storage times, temperatures and dilution ratios. **Journal of Animal Science**, v.41, p.137-143, 1975.

BADINAND, F.; FONTBONNE, A.; ADOUE, C. Préparation, conditionnement, conservation et utilisation de la semence du chien en insémination artificielle. **Elevage et Insémination**, v.239, p.3-15. 1990.

BATTELIER, F.; MAGISTRINI, M.; FALQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.48, p.391-410, 1997.

BATTELIER, F.; VIDAMENT, M.; FALQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.

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

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

BAUMGARTL, C.; BADER, H.; DROMMER, W.; LUNING, I. Ultrastructural alterations of stallion spermatozoa due to semen conservation. Proc. 9th Internat. Congr. Anim. Reprod. Al., vol. 5, pg. 134 – 137, 1980.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.

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

BRAUN, J.; TORRES-BOGGINO, F.; HOCHI, S.; OGURI, N. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 degrees. **Dtsch. Tierarztl. Wochschr.**, p.319-322, 1994.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination and preservation of semen. In.: BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Stallion management. **Vet. Clin. North America: Equine Practices**, v. 8, n. 1, p. 205-218, 1992.

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

BRUEMMERT, J.E.; COY, R.C.; SQUIRES, E.L.; GRAHAN, J.K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa storage for up to 48 hours. **Journal of Animal Science**, v.80, p.12-18, 2002.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p., 1998.

CARVALHO, G.A. **Efeito de diferentes diluentes sobre viabilidade espermática, utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen eqüino.** Botucatu, 2003. 138p. Dissertação (Mestrado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2003).

CAVALCANTE, J.M.M.; SALGUEIRO, C.C.M.; GONDIM, J.M.; CORDEIRO, M.A.; SOUZA, P.T.; DIÓGENES FILHO, R.N.; FIGUEIRÊDO, E.L.; MESQUITA, F.L.T.; NUNES, J.F. Avaliação in vivo do efeito do diluente água de coco em pó (ACP-102) sobre o sêmen de ovinos resfriado e conservado a 4°C por 24 e 48 horas. In: 57ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2005, Fortaleza. **Anais...** 2005.

COTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação, e avaliação do sêmen eqüino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.1, p.14-25, 2002.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.59, p.7-11, 1998.

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

DE MARTIN, Z.J. Processamento: produtos, características e utilização. **Frutos Tropicais – coco**, São Paulo: ITAL, 1980. p. 183-254.

DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.; VAN TOL, H.T.M.; WILLESEN, A.H. Peripheral plasma concentration of estradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the estrus cycle I the cow with emphasis on the estrus period. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.10, p.275 -292, 1986.

DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, p.291-304, 1984.

EDWARD, A.W. **Fertilidade e Obstetrícia Eqüina**. São Paulo: Varela, p.21-110, 1994.

EDWARDS, J.J.; TOLLAKSEN, S.L.; ANDERSON, N.G. Protein of Human Semen. In: Two-Dimensional mapping of human seminal fluid. **Clinical Chemistry**, p.1335-1340, 1981.

EISEMANN, B. Intravenous infusion of coconut water. **Arh. Sur.**, v.68, p.167-178, 1954.

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

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

FARINASSO, A. **Utilização de baixas doses de estrato de pituitária eqüina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2004, 60 p. Dissertação de Mestrado.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.785, 1996.

FRANCL, A.T. Unpublished data. 5296-A, Haleilio Rd., Kapoa, HI 96746, 1987.

FRANCL, A.T.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Motility and fertility of equine spermatozoa in milk extenders after 12 or 24 hr at 20C. **Theriogenology**, v.27, p.517-524, 1987.

FREITAS, V.J.F. **Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina corionica (HCG), inseminadas artificialmente.** Fortaleza, 1988. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 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.** Fortaleza, 1992. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1992).

GARNER, D. L.; HAFEZ E. S. E. Espermatozóide e Plasma Seminal. In: Hafez, E.S.E. **Reprodução Animal.** 7 ed. Barueri: Manole Ltda., p.97-110, 2004.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects.** 2 ed. Madison: Equiservices, 1992.

GOULART, H.M.; SILVA, A.E.D.F.; MCMANUS, C.; PAPA, F.O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozóides de eqüinos após o resfriamento à 5°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.112-122, 2002.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practices**, v.12, p.131-147, 1996.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, p.187-195, 2004.

HIRSH, A. **Pathophysiology and Principles of Treatment of Male Infertility.** A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. London: Parthenom. Publish Group. p.46-72, 1992.

IMV TECHNOLOGY, **Produce INRA 96 extender**. Results obtained *in vivo* and *in vitro* by INRA in the French National Stables, 1996.

JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L. Effects of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, p.1059-1067, 1991.

JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. 38th Annual Convention of American Association Equine Practitioners, **Proceedings...** p.649-660, 1992a.

JASKO, D.J.; HATHWAY, J.A.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, p.1241-1252, 1992b.

JASKO, D.J.; BEDFORD, S.J.; COOK, N.L.; MUNFORD, E.L.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effects of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, p.885-893, 1993.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinaria**, v.10, p.156-170, 1994.

JOHNSON, A.L.; BECKER, S.E. Use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment to induce multiple ovulations in the anestrus mare. **J. Equine Vet. Sci.**, Wildomar, v.8, n.2, p.130-134, 1988.

KARESKOSKI, A.M.; REILAS, T.; SANKARI, S.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Composition of fractionated stallion ejaculates. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.228-230, 2005.

KATILA, T.; ANDERSON, M.; REILAS, T.; KOSKINEN, E. Post-thaw mobility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, p.241-244, 2002.

KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HÖTT, A.; et al. Effect of method of seminal plasma removal, extender, length of storage on motility and fertility of equine semen. Anim. Reprod. Sci., **Proceedings... 3th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STALLION REPRODUCTION**. Colorado - EUA. p.318-319, 2001.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques and preliminary findings. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 21, 1975, Lexington. **Proceedings...** Lexington, p.327-336, 1975.

LAGUNA, L.E. **Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades "Cocus nucifera" coco da praia e anão**. Fortaleza, 1996. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1996).

LEBOEUF, B.; GUILLOUET, P.; BATTELIER, F.; BERNELAS, D.; BONNE, J.L.; FORGERIT, Y.; RENAUD, G.; MAGISTRINI, M. Effect of native phosphocaseinate on the *in vitro* preservation of fresh semen. **Theriogenology**, v.60, p.867-877, 2003.

LIPAR, J.L.; KETTERSON, E.D.; NOLAN, V.J.R.; CASTRO, J.M. Egg yolk, layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. **Genetic Compendium of Endocrinology**, v.115, p.220-227, 1999.

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

MARQUES, A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GOBESSO, A.A.O.; NEVES NETO, J.R. Effect of ascorbic acid and pentoxifilline on equine cryopreserved semen submitted to *in vitro* incubation. **Theriogenology**, v.58, p.257-260, 2002.

McCUE, P. et al. Efficacy of hCG at inducing ovulation: A new look at an old issue. In: 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 50, 2004, Denver, CO. **Proceedings...**Lexington: American of Equine Practitioners, v.50. 542p. p.510- 513, 2004.

McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, 1 ed., Pennsylvania: Lea & Febinger, Malvern, 1993.

MELO, N.S.S. **Efeitos de diferentes concentrações de crioprotetores na congelação de sêmen eqüino**. Brasília, 2005. 71p. Dissertação (Mestrado da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2005).

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais Domésticos**. 6 ed. Porto Alegre: Sulina, p.115-119, 1987.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, p.899-915, 1990.

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

MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.999-1012, 1992.

MORRIS, L.H.A. Histeroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.95-100, 2000.

MOURA, J.C.A.; MERKT, H. **A Ultra-sonografia na Reprodução Eqüina**. 2 ed. Salvador: Editora Universitária Americana, p.64-79, 1996.

NEELY, D.P.; KIU, I. K.M.; HILLMAN, R.B. Endocrinologia reproductiva y fertilidad en la yegua. **Reproducción Equina**, Buenos Aires: Hemisfério Sul, p.1-25, 1989.

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, 1987, Brasília. **Anais...** Brasília, 1987.

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

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

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: I SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 1995, p.53-63.

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

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n.43, supl., 5p. 2005.

NUNES, J.F.; VIEIRA, M.J.A.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; OLIVEIRA, C.M.A.; OLIVEIRA, R.V.; CAVALCANTE, J.M.M.; LIMA-VERDE, J.B.; CARVALHO, M.A.M.; MATOS, A.R.B. Utilização da água de coco em pó (ACP-104) como diluente semial na fecundação de óvulos de tambaqui. In XXXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2006, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá.

NUNES, D.B.; ZÚCCAN, C.E.S.N.; COSTA e SILVA, E.V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de égua com sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n. 1/2, p. 42-56, 2006.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Inseminação artificial com sêmen a fresco. **Revista Cavalo Mangalarga**, v.12, p.16-23, 1987.

PAPA, F. O.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A.; MACEDO, L. P.; CARVALHO, A. G.; ALVARENGA, M. A.; MEDEIROS, A. S. L. Inovações metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelação de sêmen eqüino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 19 – 27, 2005. Suplemento.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, n.2, p.255-266, 1992.

PARKS, J.E. Hypothermia and mammalian gametes. In.: KAROW, A.M.; CRITSER, J.K. **Reproductive Tissue Banking**. San Diego: Academic Press, p.229-261, 1997.

PICKETT, B.W. Seminal extenders and cooled semen. In: **Equine Reproduction**. McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Philadelphia: Lea & Febiger, p.746-754, 1993.

PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERVALL, D.K.; SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, p.3-37, 1999.

PINTO, G.P.; OLIVEIRA, A.R.C. Composição química e valor nutritivo da água de coco anão e da praia. In: REUNIÃO DE INVESTIGAÇÃO AGRONÔMICA DO NORDESTE, 1962, Recife. **Anais...** Recife, 1962.

POMMER, A.C.; LINFOR, J.J.; MEYER, S.A. Capacitation and acrossomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**, v.57, p.1493-1501, 2002.

PROVINCE, C.A.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cooling rates, storage temperature and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.23, p.925-934, 1985.

RAPHAEL, C.F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado**. 2007. Dissertação (Mestrado da Universidade de São Paulo - USP, 2007).

RIGBY, S. et al. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. In: 46th Annual American Association of Equine Practitioners Convention, 46, 2000, San Antonio, TX. **Proceedings...**Lexington: American of Equine Practitioners, v.46. 387p. p.332-334, 2000.

RITAR, A.J.; SALOMON, S. Effects of centrifugation and seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Australian Journal of Biology Science**, v.35, p.305-312, 1982.

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, 1994, Olinda. **Anais...** Olinda, 1994, p.540.

RONDON, R. M. M. **Sobrevivência in vitro dos espermatozóides de capotes (*Numida meleagris*) conservados em água de coco em pó (ACP-108) e Ovodyl em diferentes temperaturas**. Fortaleza, 2006. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências Avícolas da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 2006).

ROTA, A.; FURZI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. **Reprod Domest Anim**, v.39, p.103-9, 2004.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.L.P.; 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.**, Supl., n.5, p.96-98, 2002.

SALGUEIRO, C.C.M. **Evaluación de diferentes diluyentes en la congelación del semen caprino.** Madrid, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias da Universidad Complutense de Madrid – UCM, Espanha, 2003).

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E.; SAMPAIO-NETO, J.C.; NUNES, J.F. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.377-378, 2003.

SALGUEIRO, C.C.M.; GONDIM, J.M.; NUNES, J.F.; CORDEIRO, M.A.; CAVALCANTE, J.M.M.; MACHADO, V.P.; PINHEIRO, J.H.T. Artificial insemination of ewes with semen diluted powder coconut water (ACP-102), cooled and stored at 4°C. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.374, 2004.

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

SAMPAIO-NETO, J.C.; SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J.F. Utilization of ACP-105[®] extender in the refrigeration of stallion semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.5, p.137-139, 2002.

S.A.S.[®], **Statistical Analysis System**, SAS/STAT[®] Software, In: site: <http://www.sas.com/technologies/analytics/statistics/stat/factsheet.pdf>

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. **Ciência Rural**, v.30, p.1021-1025, 2000.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.98, n.546, p.53- 60, 2003.

SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; FONSECA, F.A. Transporte e inseminação artificial com sêmen de eqüino. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária**. UFMG, Belo Horizonte, n.11, p.3-112, 1994.

SIROIS, J.; KIMMCH, T.L.; FORTUNE, J.E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrus cycles and the hemiovariectomy in mares. **Equine Veterinary Journal**, suppl. New Market Suffolk, v.8, p.43-48, 1989.

SOBREIRA NETO, J.A. Alguns Aspectos da Inseminação Artificial no Brasil. **Folheto de publicação da ABCZ**, Uberaba-MG, 18p., 1996.

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

SQUIRES E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, D.K.; VANDERWALL, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n.9 p.3-36, 1999.

SPEIRS, V.C. **Exame Clínico dos Eqüinos**, Porto Alegre: Artmed, p.222-236, 1999.

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, 1989b, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1989b, p.138-142.

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

UCHOA, D.C.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Eficiência da monta natural e da inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas nulíparas da raça Boxer. **Ciência Animal**, v.10, n.1, p.159-160, 2000.

UCHOA, D.C. Comparação de diferentes diluidores de sêmen na inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer. **Ciência Animal**, v.12, n.1, p.131-134, 2002a.

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

VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; MELO, M.A.; MAGNAGO, L.G.P. Utilização de um container modelo CELLE modificado para resfriamento e transporte de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.505-514, 1999.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoa motility parameters. **Theriogenology**, v.28, p.709-723, 1987.

YANAGUIMACHI, R. In.: KOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press, p.189-317, 1994.

ANEXOS

ANEXO I – Certificado Andrológico

A) Identificação do Reprodutor

Nome:	Raça:	Nasc:
Registro:	Proprietário:	
Haras/Faz.:	End/Tel:	

B) Exame Clínico

1. Histórico:		
2. Estado Geral:		
3. Genital externa:	Prepúcio:	Pênis:
Circunferência Escrotal (cm):		Obs:
Testículos	Esquerdo	Direito
Dimensões (comp., alt., larg.):		
Simetria:		
Forma:		
Posição:		
Consistência:		
Sensibilidade dolorosa:		
Mobilidade:		
Epidídimo:		
4. Genitália Interna:		
Libido:	Exposição (min.):	Tempo Salto(min.):

C) Espermiograma:

I. Método de Coleta:	Data:	Hora:
II. Característica do Ejaculado		
1. Volume total/sem gel (ml):	/	2. Cor:
3. Aspecto:		4. Turbilhonamento(0-5):
5. Motilidade (%):		6. Vigor (0-5):
7. Concentração (x10 ⁶):		8. Total espermat.(x10 ⁶):
III. Características Morfológicas		
Defeitos maiores (%):	Defeitos menores (%):	Total (%):
IV. Outros Elementos:		
(1. Medusa, 2. Cél. Primordiais, 3.Cél. gigantes, 4. Leucócitos, 5. Hemácias, 6. Cel epiteliais, 7. Cristais, 8. Bactérias		
Observações:		

D) Conclusão:

Veterinário Responsável

ANEXO II – Controle Reprodutivo

Reprodutora: _____ Raça: _____ Idade: _____
Garanhão: _____ Espécie: _____ Raça: _____
Contato(nome/tel.): _____.

Mês	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31