



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

IVON TEIXEIRA DE SOUZA

**ÁGUA DE COCO EM PÓ COMO MEIO DE DILUENTE NA PREPARAÇÃO DO
SÊMEN HUMANO PARA UTILIZAÇÃO EM REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

FORTALEZA – CEARÁ

2017

IVON TEIXEIRA DE SOUZA

ÁGUA DE COCO EM PÓ COMO MEIO DE DILUENTE NA PREPARAÇÃO DO
SÊMEN HUMANO PARA UTILIZAÇÃO EM REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

Coorientadora: Profa. Dra. Erika Caldas Silveira.

FORTALEZA – CEARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Souza, Ivon Teixeira de.

Água de coco em pó como meio de diluente na preservação do sêmen humano para utilização em reprodução assistida [recurso eletrônico] / Ivon Teixeira de Souza. - 2017.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 53 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, , Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2017.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientação: Prof. Ph.D. José Ferreira Nunes.

Coorientação: Prof.^a Dra. Erika Caldas Silveira.

1. Infertilidade masculina. 2. Reprodução humana assistida. 3. Água de coco. I. Título.

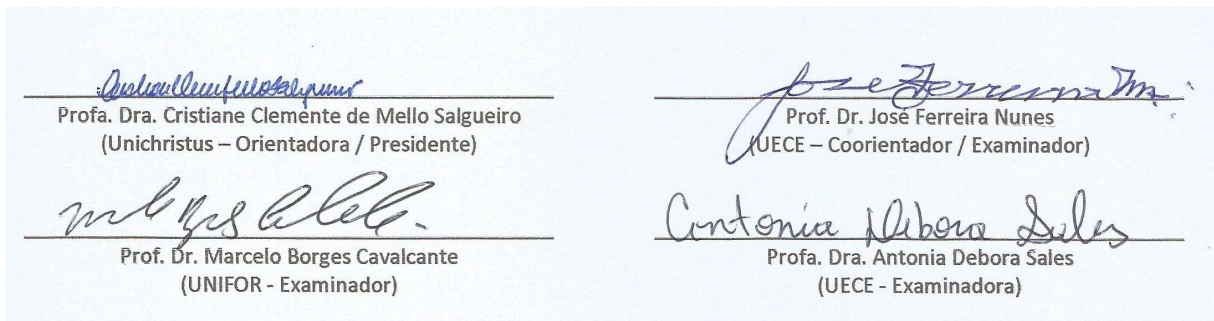
IVON TEIXEIRA DE SOUZA

ÁGUA DE COCO EM PÓ COMO MEIO DE DILUENTE NA PREPARAÇÃO DO
SÊMEN HUMANO PARA UTILIZAÇÃO EM REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 12 de abril de 2017.

BANCA EXAMINADORA



À minha esposa Ana Valéria Carneiro
Teixeira e aos meus filhos Gabriela,
Danilo e Guilherme, pelo apoio
incondicional nos momentos de ausência.
À minha mãe, Socorro Teixeira por suas
bênçãos e orações.

AGRADECIMENTOS

Aos mestres que deram o apoio e o incentivo fundamentais a conclusão de mais essa etapa da minha vida acadêmica, em especial:

Ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes, o qual minha admiração cresce a cada dia pela sua bravura e pioneirismo nos caminhos científicos em uma realidade tão adversa.

À Profa. Dra. Cristiane Clemente Salgueiro, pela sua disponibilidade e generosidade.

À Profs. Erika Caldas Silveira, pelo incentivo e apoio logístico na realização dos experimentos.

Ao Dr. Hermano, pela orientação estatística.

À Dra. Ana Valéria Carneiro Teixeira, mestre pela UECE, minha esposa, pela colaboração com as diversas leituras e edição da minha dissertação.

À minha querida filha Gabriela Carneiro Teixeira, acadêmica de Medicina, pela ajuda tecnológica e gráfica.

Finalmente a Deus, por ter me confiado tão sublime missão de Médico, Professor e Estudante, humilde para saber que sempre temos o que aprender e crescer.

RESUMO

A infertilidade conjugal acomete 15% dos casais em idade fértil com comprometimento financeiro, médico e social. O homem deve ser avaliado concomitante com a mulher e o fator masculino está envolvido em 50% dos casos. A maioria dos problemas masculinos não é tratável ou corrigível requerendo, portanto, o uso de técnicas de reprodução assistida. Uma das etapas importantes dessas técnicas é a lavagem do sêmen com recuperação de espermatozoides com motilidade e morfologia normais. O estudo objetivou foi avaliar a utilização do meio à base de água de coco em pó (ACP-113up) na recuperação de espermatozoides. Amostras seminais normozoospermicas de 50 voluntários foram coletadas através de masturbação no período de janeiro a fevereiro de 2016. Utilizou-se os seguintes meios: PBS, HTF e ACP-113up. A avaliação seminal foi realizada em dois momentos: (1) Lavagem seminal; e (2) *Swim up*. Foram formados os seguintes Grupos Experimentais: GC = Grupo Controle (sêmen fresco); G1 = Grupo 1 (padrão ouro; lavagem com PBS e *swim up* com HTF); G2 = Grupo 2 (lavagem com PBS e *swim up* com ACP-113up). Os parâmetros descritivos das análises seminais foram expressos a partir de suas medianas. As diferenças entre os grupos em relação aos parâmetros do sêmen fresco foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney para avaliação da significância estatística das diferenças encontradas com $p < 0,05$. Após a avaliação do sêmen observou-se que o grupo 2 selecionou um menor número de espermatozoides móveis mas com morfologia melhor do que o grupo 1. Conclui-se que a água de coco em pó pode ser uma alternativa ao meio padrão. Estudos são necessário para avaliar a funcionalidades dos espermatozoides selecionados.

Palavras-chave: Infertilidade masculina. Reprodução humana assistida. Água de coco.

ABSTRACT

Marital infertility affects 15% of couples of childbearing age with financial, medical and social commitment. The man should be evaluated concomitantly with the woman and the male factor is involved in 50% of the cases. Most male problems are not treatable or correctable, therefore requiring the use of assisted reproductive techniques. One of the important steps of these techniques is the washing of the semen with recovery of spermatozoa with normal motility and morphology. The purpose of this study was to evaluate the use of coconut water powder (ACP-113up) in the recovery of spermatozoa. Membrane samples from 50 volunteers were collected through masturbation from January to February 2016. The following media were used: PBS, HTF and ACP-113up. The seminal evaluation was performed in two moments: (1) Seminal washing; And (2) Swim up. The following Experimental Groups were formed: GC = Control Group (fresh semen); G1 = Group 1 (gold standard; wash with PBS and swim up with HTF); G2 = Group 2 (wash with PBS and swim up with ACP-113up). The descriptive parameters of the seminal analyzes were expressed from their medians. The differences between the groups in relation to the fresh semen parameters were evaluated by the Mann-Whitney test to evaluate the statistical significance of the differences found with $p < 0.05$. After the semen evaluation, it was observed that group 2 selected a smaller number of moving spermatozooids but with better morphology than group 1. It was concluded that powdered coconut water may be an alternative to the standard medium. Studies are required to evaluate the functionalities of the selected spermatozoa.

Keywords: Male infertility. Spermatozoa. Coconut water.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Água de coco
ACE	Água de coco estabilizada
ACIN	Água de coco <i>in natura</i>
ACL	Água de coco liofilizada
ACP	Água de coco em pó
C	Cabeça
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Flagelo
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
HTF	<i>Human Tubal Fluid</i>
HSA	Albumina do soro humano
IAA	Ácido 3- indol acético
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PI	Peça intermediária
RHA	Reprodução humana assistida
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SSS	Substituto de soro sintético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	INFERTILIDADE MASCULINA.....	14
2.2	REPRODUÇÃO ASSISTIDA.....	18
2.2.1	Preparação dos espermatozoides.....	18
2.2.2	Técnicas de preparação do sêmen.....	19
2.2.3	Técnica de lavagem simples.....	20
2.2.4	Swim up.....	20
2.2.5	Gradiente de densidade.....	21
2.2.6	Técnicas de reprodução assistida (TRA).....	22
2.2.7	Inseminação intrauterina.....	23
2.2.8	Fertilização <i>in vitro</i> clássica (FIV).....	24
2.2.9	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)....	25
2.3	ÁGUA DE COCO.....	26
2.3.1	A importância econômica da água de coco.....	26
2.3.2	Água de coco e reprodução animal.....	27
2.3.3	Água de coco em pó.....	28
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	METODOLOGIA.....	32
5	RESULTADOS.....	36
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	ANEXOS.....	52
	ANEXO A – COMPROVANTE SUBMISSÃO ARTIGO.....	53

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade conjugal é um problema comum e impacta negativamente a qualidade de vida daqueles que são afetados. Estima-se que 13 a 15% dos casais, no mundo têm infertilidade. A prevalência varia amplamente sendo menos comum em países desenvolvidos. No Reino Unido um em cada seis casais apresenta infertilidade.

A cada oito casais, um encontra dificuldade quando tenta conceber seu primeiro filho, e um em cada seis casais que tenta conceber os filhos subsequentes (JUNGWRITH, 2013).

Considerada um problema de saúde comum, a infertilidade conjugal tem importantes implicações psicológicas, demográficas, econômicas e médicas. As consequências da infertilidade conjugal são numerosas levando a repercussões sociais e sofrimento do casal podendo, contudo, interferir negativamente na vida sexual dos envolvidos (BIRADAR, 2016).

Um casal é considerado infértil quando não consegue engravidar nos 12 meses anteriores a avaliação médica a despeito de terem relações sexuais frequentes e desprotegidas em cada um desses meses (CHANDRA, 2013).

Existem diferentes causas de infertilidade conjugal e as mais comuns são: problemas masculinos (alterações espermáticas), femininos (disfunção ovulatória, obstrução tubária), problemas acometendo ambos os parceiros; e há situações onde uma causa óbvia da infertilidade não é conhecida (infertilidade inexplicada) (KAMEL, 2010).

Entre casais jovens e saudáveis a probabilidade de obter gravidez, por ciclo, é de aproximadamente 20 a 25%. A probabilidade cumulativa de concepção é de 60% nos primeiros seis meses, 84% no primeiro ano e 92% em dois anos (KAMEL, 2010)

A infertilidade pode ser primária (se nunca houve gravidez) ou secundária (se houve gravidez independente do seu resultado).

Sabe-se que em 35% dos casais a causa da infertilidade é um problema masculino. Em outros 35% a causa é feminina. Em 20% dos casos, ambos se apresentam com alterações. Há ainda casais (10%) que não conseguem engravidar mesmo com exames normais.

A avaliação da infertilidade é indicada para casais que não conseguem engravidar após 12 meses de regular intercurso sexual sem proteção. A investigação e tratamento mais precoce pode ser justificado baseado na história médica e achados no exame físico. A avaliação mais precoce se torna mais relevante para casais onde a mulher tem mais de 35 anos, o homem mais de 45 anos ou quando existe uma causa óbvia de infertilidade (ESTEVEES, 2011; PRACTICE COMMITTEE, 2015).

A análise seminal é o exame mais utilizado para avaliar a fertilidade masculina contribuindo para determinar a severidade do problema. O sêmen deve ser colhido preferencialmente no laboratório após um período de abstinência de dois a quatro dias. O exame do sêmen oferece informação sobre o volume seminal, concentração espermática, motilidade e morfologia dos espermatozoides (PRACTICE COMMITTEE, 2015).

A maioria dos estudos sobre epidemiologia e etiologia da infertilidade masculina tem usado os critérios de análise seminal advogados pela OMS. Entretanto um significativo número de homens que têm uma análise seminal normal, de acordo com esses critérios, são inférteis. Essa análise é descritiva e não leva em consideração a capacidade funcional dos espermatozoides (CAMPBELL, 2000).

Os parâmetros seminais (concentração, motilidade e morfologia) são determinados de acordo com os valores de referência do manual da OMS. Se a amostra apresenta mais de 40 milhões de espermatozoides, 32% deles móveis e mais de 4% com forma normal, ela é definida com uma amostra normozoospermica (KILESCH, 2014).

Esses parâmetros têm sido utilizados para classificar a fertilidade masculina. Em um estudo comparando a concentração, morfologia e motilidade dos espermatozoides entre homens férteis e inférteis participantes de um estudo clínico de superovulação e inseminação intrauterina observou-se que os valores que prediziam fertilidade eram concentração >48 milhões/ml, motilidade >63% e morfologia >12% e os que prediziam infertilidade eram <13,5 milhões/ml, motilidade <32% e morfologia <9% (GUZICK, 2001).

Diante de um casal com infertilidade procura-se diagnosticar a causa do problema. Uma vez identificada a razão da infertilidade esta pode ser curada, melhorada ou mesmo não existir tratamento para sua correção. O objetivo inicial é

devolver ao causal sua capacidade para engravidar naturalmente, através das relações sexuais.

O tratamento da infertilidade, empregando técnicas de reprodução assistida, inicia-se com as de baixo custo e baixa tecnologia como a inseminação intrauterina (IIU) migrando-se depois para técnicas de alto custo e mais invasiva como a fertilização *in vitro* (FIV) (CHAMBERS, 2010).

O plasma seminal é importante para os espermatozoides penetrarem o muco cervical porém, alguns de seus componentes, são obstáculos para obtenção de gravidez quando barreiras naturais são ultrapassadas quando se emprega as técnicas de reprodução assistidas tais como IIU e IVF. A separação dos espermatozoides humanos do plasma seminal para obter uma preparação contendo uma alta porcentagem de células móveis e morfolologicamente normais livres de debris, células não germinativas e espermatozoides mortos é importante para prática clínica (OMS, 2010).

A água de coco tem sido utilizada em biotecnologias da reprodução animal obtendo-se bons resultados ao ser utilizada na preservação do sêmen de animais domésticos como caprinos (CAVALCANTE, 2008).

Diluidores de sêmen à base de água de coco apresentam como vantagens o baixo custo e fácil preparo. Entretanto, a água de coco apresenta dificuldades quando à conservação por longos períodos após sua extração do fruto, limitações na disponibilidade do fruto em regiões onde há a carência do vegetal, além de variações na constituição bioquímica da água de coco entre diferentes frutos. Isto motivou o desenvolvimento do produto água de coco em pó (ACP), onde os constituintes nutricionais da água de coco são obtidos em sistema de desidratação a alto vácuo. O produto ACP se caracteriza por possuir composição padronizada, obtido a partir de frutos oriundos de plantações orgânicas certificadas, além de possuir características bioquímicas similares às da água de coco *in natura* (CAVALCANTE, 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFERTILIDADE MASCULINA

A infertilidade masculina pode ser devida a uma série de condições algumas das quais podem ser identificadas e tratadas. Quando a causa da anormalidade seminal não pode ser identificada essa situação é definida como idiopática. Idealmente a identificação e tratamento de causas tratáveis pode habilitar o casal em obter uma gravidez natural (PRACTICE COMMITTEE, 2015).

Em metade dos casais inférteis, o parceiro masculino tem pelo menos um parâmetro seminal abaixo do limite da normalidade preconizado pela Organização Mundial da Saúde (HOTALING, 2014).

Alterações na fertilidade masculina podem decorrer de disfunção hipotalâmica-hipofisária, do próprio testículo ou da região pós-testicular. Em geral a infertilidade masculina é um pobre indicador das chances de o casal obter uma gravidez natural (KLIESCH, 2014).

A análise seminal é o pilar da avaliação laboratorial da infertilidade masculina e permite definir a severidade do fator masculino. O sêmen deve ser coletado no laboratório através de masturbação e analisado dentro de uma hora após a coleta (PRACTICE COMMITTEE, 2015).

A avaliação do sêmen, o espermograma, permite informação sobre o volume ejaculado assim como da vitalidade, concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (parâmetros seminais).

A maioria dos estudos sobre epidemiologia e etiologia da infertilidade masculina tem usado os critérios de análise seminal advogados pela OMS. Entretanto um significativo número de homens que têm uma análise seminal normal, de acordo com esses critérios, são inférteis. Essa análise é descritiva e não leva em consideração a capacidade funcional dos espermatozoides (CAMPBELL, 2000).

Em 2010 a Organização Mundial da Saúde reeditou o manual de técnica laboratoriais para manipulação do sêmen humano e atualizou os valores de referência para os parâmetros seminais, conforme ilustrado no quadro 1 a seguir.

Quadro 1 – Valores de referências para parâmetros do sêmen humano

Parâmetros	Valores	Se abaixo do limite normal
Volume	1,5 ml	Hipospermia
Concentração /ml	15 milhões/ml	Oligozoospermia
Motilidade (A + B)	32%	Astenozoospermia
Morfologia (b)	4%	Teratozoospermia

Fonte: OMS (2010). Elaborado pelo próprio autor.

Motilidade A = movimento espermático rápido e progressivo; Motilidade B = movimento progressivo lento; b = morfologia baseada nos critérios estritos de Kruger.

Baseados nesses critérios a OMS usa nomenclatura descritiva para caracterizar a infertilidade masculina de acordo com os valores encontrados. Dessa forma, termos que hipospermia, oligozoospermia, astenozoospermia e teratozoospermia relacionam-se a amostra seminal com volume, concentração, motilidade e morfologia abaixo dos limites, respectivamente (HAMILTON, 2015).

Apesar desses parâmetros mostrarem alguma acurácia, estudos avaliando o valor preditivo deles na população infértil, não encontraram correlações significativas entre eles e a probabilidade de concepção. Dessa forma, a classificação da OMS se mostra de pequena relevância para o prognóstico do casal, assim como para a escolha do tratamento (HAMILTON, 2015).

As causas de infertilidade masculina são:

- anormalidades urogenitais congênitas ou adquiridas;
- neoplasias;
- infecção urogenital;
- elevação da temperatura escrotal (varicocele);
- distúrbios endócrinos;
- anormalidades genéticas;
- problemas imunológicos;
- idiopáticas.

Entre as anormalidades congênitas ou adquiridas se incluem a varicocele e a criptorquidia. A varicocele, dilatação das veias do plexo pampiriforme que drenam os testículos, acomete 21 a 40% dos homens que se apresentam com infertilidade primária e 75 a 81% com infertilidade secundária. O exato mecanismo pelo qual a varicocele afeta a fertilidade masculina ainda não é conhecido. Tem-se proposto que a hipóxia, estase, temperatura testicular elevada, refluxo de

catecolaminas adrenais e aumento do estresse oxidativo contribuem para as alterações espermáticas observadas na varicocele (REDDY, 2014).

A criptorquidia, testículo não posicionado na bolsa escrotal, é a anomalia congênita mais comum da genitália masculina com incidência entre 2,7 e 3,2% dos recém-nascidos a termo (PIPPI SALLE, 1994). Redução na fertilidade é observada com criptorquidia uni ou bilateral. Aproximadamente 90% dos pacientes com criptorquidia bilateral apresentam azoospermia, enquanto na população geral este índice é de 0,4% (GOEL, 2013).

As neoplasias têm ação multifatorial na redução da fertilidade. Elas podem alterar o ambiente hormonal e metabólico do paciente. A doença pode acarretar redução dos hormônios necessários à reprodução. Além disso, os tumores malignos podem resultar em desnutrição e deficiência em minerais, oligoelementos e vitaminas necessários à espermatogênese. Algumas neoplasias podem cursar com períodos de febre o que acarretar mal função gonadal (DHOLE, 2010).

O tratamento dos tumores malignos, seja com quimioterapia, principalmente quando se usa agentes alquilantes (ciclofosfamida, ifosfamida), seja com radioterapia, se aplicada nas gônadas e acima de 4 Gy, podem resultar em azoospermia (DHOLE, 2010).

Vários agentes infecciosos como bactérias, fungos, vírus e parasitas podem causar distúrbios reprodutivos em ambos sexos. Aproximadamente 8 a 35% dos homens inférteis apresentam infecção e inflamação do trato gênito-urinário. Entre as diferentes áreas do trato reprodutivo masculino que podem ser acometidas com agentes infecciosos são os testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (RANA, 2016).

A associação entre anormalidades genéticas e infertilidade masculina já é conhecida há alguns anos, ela é mais clara em homens com azoospermia e oligozoospermia severa (< 5 milhões de espermatozoides/ml). Como a produção espermática requer a coordenação de milhares de genes, é provável que alterações genéticas possam estar relacionadas aos casos onde a causa da infertilidade masculina não é determinada. Desordens genéticas podem ser divididas em alteração genética simples ou mendeliana, cromossômica e não mendelianas. As desordens mendelianas são causadas por um ou um par de alelos mutantes como ocorre na fibrose cística. A fibrose cística é uma doença autossômica recessiva acometes uma em cada 1.600 pessoas do norte europeu e resulta, entre outras

anormalidades, em agenesia dos ductos deferentes, resultando em azoospermia. As anormalidades cromossômicas são causadas por perda, ganho ou rearranjo de um ou mais dos 46 cromossomos. A síndrome de Klinefelter (47, XXY) é a mais comum anormalidade cromossômica observada em pacientes com infertilidade e sob avaliação genética. Com prevalência de 1:600 homens é a causa genética mais comum de azoospermia. As alterações cromossômicas microscópicas ou submicroscópica resultam da perda, ganho ou rearranjo dentro de um cromossomo ou entre cromossomos. Perdas de porções do cromossomo Y são referidas como microdeleções pois não são detectadas na análise cariotípica padrão. Elas ocorrem em 5 a 10% dos pacientes com oligozoospermia severa e azoospermia não obstrutiva, respectivamente (HOTALING, 2014).

A infertilidade masculina decorrente da ação de anticorpos anti-espermatozoides é rara. O surgimento desses anticorpos advém da exposição de antígenos dos espermatozoides ao sistema imune através da ruptura da barreira hemato-testicular. Essa exposição ocorre em casos de varicocele, trauma genital, infecção genital e pós-vasectomia. Suspeita-se da presença desses anticorpos em paciente com alteração isolada da motilidade ou que apresente aglutinação espermática (PRACTICE COMMITTEE, 2015).

Em 30 a 40% dos casos nenhuma causa para a infertilidade masculina é encontrada. Esses homens não têm história prévia de doenças afetando sua fertilidade e apresentam exame físico e testes laboratoriais endocrinológicos sem alterações. Entretanto, a análise seminal apresenta diminuição no número dos espermatozoides (oligozoospermia), no número de móveis (astenozoospermia) ou dos que apresentam formato normal (teratozoospermia). Usualmente essas alterações ocorrem simultaneamente, o que se chama de síndrome da oligoteratoastenozoospermia (OTA síndrome) (JUNGWRITH, 2012).

Os fatores prognósticos da infertilidade masculina são:

- duração da infertilidade;
- infertilidade primária ou secundária;
- resultado da análise seminal;
- idade e fertilidade da parceira.

Quando a gravidez não é possível de ser alcançada pode-se então oferecer ao casal técnicas de reprodução assistida. Dependendo do diagnóstico da

infertilidade as técnicas aplicadas são a inseminação intra-uterina (IIU) ou fertilização *in vitro* (FIV) com sêmen homólogo ou heterólogo. O sucesso de tratamento de casais inférteis tem feito substancial progresso nas últimas duas décadas. Casais inférteis são definidos como casais que têm tentado sem sucesso engravidar por pelo menos um ano a despeito de regular e desprotegido intercursos sexual (BOOMSMA, 2003).

2.2 REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Somente um limitado número de homens tem uma causa primária de infertilidade potencialmente tratável. Em algumas situações, o problema é de causa inexplicável e o tratamento empírico se mostrou de pouca eficiência. Nestes casos e naqueles onde um tratamento específico não resulta em sucessos, as técnicas de reprodução assistida podem ser utilizadas com tratamento de segunda linha (TOURNAYE, 2012).

Com o observado aumento da demanda por técnicas de reprodução assistida tem havido uma constante melhora nos procedimentos rotineiramente empregados nos laboratórios. Um dos procedimentos mais trabalhado se relaciona com a preparação dos espermatozoides (VOLPES, 2016).

Várias técnicas de manipulação dos espermatozoides são conhecidas e amplamente usadas em todo o mundo mas não há consenso qual é a melhor (VOLPES, 2016).

2.2.1 Preparação dos espermatozoides

O ejaculado humano é formado por vários componentes em adição aos espermatozoides tais como o líquido seminal, células epiteliais, espermatozoides mortos e jovens, células do sangue e alguns casos presença de bactérias. Estes componentes estão envolvidos na produção substâncias tóxicas que podem interferir com a fertilização do ovo. Por esta razão a remoção dos espermatozoides do fluido seminal é um passo muito importante nos procedimentos de reprodução assistida (KIM, 2015).

O plasma seminal é importante para os espermatozoides penetrarem o muco cervical porém, alguns de seus componentes, são obstáculos para obtenção

de gravidez quando barreiras naturais são ultrapassadas nas técnicas de reprodução assistidas tais como IIU e FIV. A separação dos espermatozoides humanos do plasma seminal para obter uma preparação contendo uma alta porcentagem de células móveis e morfologicamente normais livres de debris, células não germinativas e espermatozoides mortos é importante para prática clínica (OMS, 2010).

Desde o nascimento de Louise Brown em 25 de julho 1978 e o subsequente início de reprodução assistida em humanos, os cientistas se empenharam em melhorar as técnicas de separação dos espermatozoides. O primeiro método de separação disponível compreendia somente em dois procedimentos de lavagem com subsequente ressuspensão dos espermatozoides (HENKEL, 2003).

Diluir o sêmen com meio de cultura e centrifugação é ainda usado para preparar amostras normozoospérmicas para IIU. Entretanto, centrifugação em gradiente de diluição e *swim up* direto são geralmente preferidos para amostra com uma ou mais anormalidades nos parâmetros seminais (OMS, 2010).

2.2.2 Técnicas de preparação do sêmen

Uma técnica de preparação de sêmen ideal, envolve a remoção do plasma seminal de forma rápida e eficiente. Embora o plasma seminal proteja os espermatozoides de condições deletérias como estresse oxidativo, ele está misturado com espermatozoides velhos, leucócitos, células epiteliais, debris e contaminação microbial. O plasma seminal contém fatores que inibem a habilidade na fertilização dos espermatozoides e reduzem a indução da capacitação (ALLAMANENI, 2005).

Estudos têm indicado que espermatozoides humanos aumentam significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta a repetidos ciclos de centrifugação envolvidos em técnicas convencionais de preparação dos espermatozoides utilizadas em reprodução humana (MAKKER, 2009).

Um nível elevado de ROS acarreta lesão no DNA do espermatozoide, decréscimo na motilidade, aumento do número de espermatozoide em apoptose e reduz a integridade da membrana plasmática do espermatozoide (MAKKER, 2009).

Redução nos índices de fertilização e precária clivagem dos embriões têm sido relacionadas em casos de infertilidade onde as amostras seminais contêm elevada frequência de lesão no DNA (SAKKAS, 2002).

Os mais comuns protocolos de processamento de sêmen usados nos laboratórios de TRA são o *swim up* e o gradiente de densidade.

A despeito do uso disseminado destas técnicas, não existe consenso qual delas é a mais adequada também considerando custo e tempo de execução (VOLPES, 2016).

2.2.3 Técnica de lavagem simples

Nesse método, adiciona-se meio de cultura ao ejaculado após liquefação do sêmen. Realiza-se centrifugação com baixa força (500 g) para minimizar os danos produzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS) oriundos de espermatozoides inviáveis e leucócitos.

A técnica de lavagem simples é usualmente utilizada quando o sêmen tem parâmetros excelentes. Esta técnica é frequentemente utilizada na preparação dos espermatozoides para inseminação intrauterina.

2.2.4 Swim up

O *swim up* é a técnica mais comumente usada em laboratórios de FIV, sendo preferida nas amostra de sêmen que têm um bom número de espermatozoides normais (normozoospermia). Os espermatozoides são selecionados pela sua motilidade e capacidade de nadar para fora do plasma seminal. Após liquefação da amostra, todo o volume é dividido em frações de 1 ml dentro dos tubos a serem centrifugados. Em seguida, após a centrifugação, aspira-se o sobrenadante e 1,3 ml de meio de cultura é colocado sobre o *pellet* em cada tubo. Os tubos são mantidos em uma incubadora a 37 °C, inclinados em ângulo de 45° por 30-60 min. Após esse tempo, os tubos retornam à posição vertical e 1 ml do sobrenadante de cada tubo é gentilmente removido, aspirando com uma pipeta estéril (NATALI, 2011).

Essa técnica em comparação com gradiente de concentração mostrou-se separar espermatozoides com menor índice de fragmentação do DNA. Existe uma

relação indireta entre fragmentação do DNA e a taxa de sucesso com as técnicas de reprodução assistida (VOLPES, 2016).

2.2.5 Gradiente de densidade

Com essa técnica os espermatozoides são separados de acordo com sua densidade ao fim da centrifugação. Em um tubo de ensaio coloca-se 2,0 ml do meio com maior densidade e sobre este adiciona-se 2,0 ml do meio com menor densidade. Em seguida 2,0 ml de sêmen liquefeito é cuidadosamente colocado na superfície e centrifugado por 20 min. a 1600 g. Espermatozoides com morfologia normal e alterada têm densidade diferentes. Os morfologicamente normais têm densidade de até 1,10 g/ml, enquanto os anormais têm densidade entre 1,06 g/ml e 1,09 g/ml (MAKKER, 2009).

O gradiente de densidade pode ser contínuo ou descontínuo. No contínuo dois níveis de densidade gradualmente aumentam a partir da superfície. No descontínuo, vários níveis de densidade vão sendo formados com adição de meios com densidade progressivamente menor do que o anterior. O gradiente contínuo compreende a mais comumente usada técnica na preparação dos espermatozoides para as técnicas de reprodução assistida (OSHIO, 1987).

Existem escassos estudos comparando o *swim up* com o gradiente descontínuo de concentração e diferentes conclusões têm sido extraídas. Em uma meta-análise comparando os diferentes métodos de preparação de espermatozoides para aplicação na IIU mostrou que não houveram dados suficientes para concluir sobre a superioridade de um método sobre o outro (BOOSMA, 2007).

No estudo de Fácio *et al.* (2016) comparando *swim up* e gradiente descontínuo de concentração observou que após preparação dos espermatozoides, amostra com menor concentração, porém com maior morfologia foi obtida com o *swim up*. Esse resultado revelou que o *swim up* tem maior potencial de recuperar espermatozoides com morfologia normal do que o gradiente descontínuo de concentração. O estudo concluiu que a utilização do gradiente descontínuo de concentração resulta em amostra, após preparação, com bons parâmetros seminais e que esta técnica deveria ser escolhida para amostra com menor concentração espermática. Em contra partida o *swim up* seria indicado para amostra

normozoospermica pois é mais eficiente na recuperação de espermatozoides com melhor morfologia.

2.2.6 Técnicas de reprodução assistida (TRA)

O emprego de técnicas de reprodução assistida envolve uma variedade de procedimentos para separar os espermatozoides do plasma seminal com o objetivo de selecionar os gametas mais viáveis para fertilizar o óvulo (VOLPES, 2016).

Desde o nascimento de Louise Brown, o primeiro nascimento resultante da fertilização *in vitro* (FIV) em 1978, o uso das tecnologias de reprodução assistida como a FIV, tem transformado o tratamento da infertilidade conjugal.

Essas tecnologias que por definição envolvem o manuseio de gametas e embriões demanda influência econômica e médica reprodutiva em países desenvolvidos.

Estima-se que 3,5 milhões de crianças tenham nascido no mundo decorrente da aplicação de tratamento com TRA. O número de ciclos realizados em alguns países desenvolvido tem crescido 5 a 10% por ano nos últimos cinco anos.

O elevado uso da TRA provavelmente reflete a tendência de adiar a gravidez e seu impacto associado na redução da fecundidade relacionada com a idade, obesidade e algumas doenças sexualmente transmitidas bem como um crescente conhecimento e aceitação das tecnologia reprodutivas (CONNOLLY, 2010).

Embora a definição varie, técnica de reprodução assistida é definida como qualquer procedimento que envolva manuseio de óvulo, espermatozoide ou de ambos fora do corpo humano (*in vitro*). As técnicas incluem fertilização *in vitro* (FIV) com ou sem injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e inseminação intrauterina (OKUN, 2014).

As técnicas de reprodução assistida são responsáveis por 1,7 a 4% das gravidezes e têm sido tradicionalmente aplicadas para infertilidade primária ou secundária (OKUN, 2014).

Qual técnica de reprodução assistida utilizar ainda hoje é uma questão de debate. A necessidade de testes que possam indicar qual a melhor técnica a ser empregada é desejo dos médicos e pacientes. Sabe-se que o diagnóstico, baseado

nos parâmetros seminais propostos pela OMS, têm pouca relevância no que refere ao prognóstico e a escolha do tratamento (TOURNAYE, 2012).

Devido à pouca acurácia dos parâmetros seminais, tem sido proposto a “Contagem Total de Espermatozoides Móveis” pós-lavagem como teste para distinguir qual a melhor maneira de tratar o casal infértil. Para obter-se este número, multiplica-se o volume seminal pela concentração (espermatozoides/ml) e pela motilidade A+B e divide-se o valor por 100 (HADJER, 2016).

2.2.7 Inseminação intrauterina

A inseminação intrauterina (IIU) é amplamente reconhecida como um tratamento útil para casais inférteis. Recomenda-se como a primeira escolha de tratamento para infertilidade das mais variadas causas. É mais barata e menos invasiva que a fertilização *in vitro* (FIV) e pode ser repetida em intervalo curto de tempo. Entretanto, um ponto negativo é que o índice de sucesso por ciclo é menor do que com a FIV (YAVAS, 2004).

Esta técnica é um tratamento de rotina para infertilidade conjugal. Indicações para IIU são anormalidades no muco cervical, infertilidade inexplicada e leve a moderada infertilidade masculina. A IIU é usualmente a primeira escolha no tratamento da infertilidade antes de iniciar uma técnica mais cara e invasiva como a fertilização (KLEPPE, 2014).

Um estudo randomizado e controlado de espermatozoides preparados comparado com não preparados mostrou que a amostra preparada aumentou significativamente a probabilidade de gravidez após IIU em um grupo de casais com subfertilidade masculina (GOLDENBERG, 1992).

O uso de espermatozoides frescos não processados em IIU tem sido relatado causar cólicas uterinas, doença inflamatória pélvica, endometrite, cervicite ou vaginite bem como uma maior probabilidade de abortos, parto prematuro ou feto mau formado (WANG, 1991).

Nessa técnica utiliza-se sêmen do próprio marido (homólogo) ou de doador (heterólogo). O sêmen passa por um processamento onde somente os melhores espermatozoides são utilizados. Esses espermatozoides selecionados são depositados através de uma sonda na cavidade uterina (DONG, 2011).

As indicações da inseminação intrauterina são variadas podendo ser tanto por problema feminino como também masculino e mesmo em casos de infertilidade não explicada. Nos casais onde o fator masculino é causa da infertilidade indica-se a inseminação intrauterina quando o número total de espermatozoides móveis é superior a 5 milhões/ml em sêmen não processado (HAJDER, 2016).

A escolha da IIU com método para tratamento do casal infértil depende do número de espermatozoides móveis obtidos com as técnicas de processamento do sêmen. Wainer et al. (2004) avaliaram a influência do número de espermatozoides móveis e da morfologia no sucesso da IIU e observaram que a porcentagem de gravidez clínica por ciclo foi de 3,13% quando se inseminou com até 1 milhão de espermatozoides e de 14,75% quando se inseminou com mais de 5 milhões de espermatozoides. Quando a porcentagem de morfologia normal após a preparação dos espermatozoides era menor de 30% e o número de espermatozoides inseminados menor que cinco milhões, o índice de gravidez clínica foi de 5,43%. A inseminação, nesse cenário, com mais de cinco milhões de espermatozoides resultou em 18,42% de gravidez. A porcentagem de espermatozoides normais não influenciou o resultado quando se inseminou com mais de cinco milhões. Eles recomendam, de acordo com os resultados obtidos, que para casais com índice de morfologia menor do que 30% após preparação dos espermatozoides só devem ser tratados com IIU se o número de espermatozoides a ser inseminados for maior do que cinco milhões. Caso esse limite de espermatozoides móveis não seja atingido o casal é direcionado para FIV.

2.2.8 Fertilização *in vitro* clássica (FIV)

As técnicas de fertilização *in vitro*, que por definição envolve o manuseio de gametas e embriões, demandam influência econômica e médica reprodutiva em países desenvolvidos.

Atualmente aproximadamente 1% das crianças nascidas no Estados Unidos são provenientes da aplicação desta técnica. Na FIV clássica os óvulos são coletados através de ultrassom transvaginal após estimulação ovariana. Dependendo da maturidade dos oócitos, 2 a 3 h depois da coleta eles são incubados com os espermatozoides em um disco contendo meio de cultura. A concentração de espermatozoides varia entre 50.000 e 100.000/ml.

É estimado que 3,5 milhões de crianças tenham nascido em todo o mundo com o emprego de técnica de reprodução assistida. Essas crianças correspondem a 4% dos nascimentos em alguns países europeus. O número de ciclos realizados em países desenvolvidos tem crescido 5 a 10% por ano nos últimos cinco anos (FERRARETI, 2009).

A reprodução assistida compreende duas técnicas: a FIV clássica e a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Embora a FIV tenha sido proposta inicialmente para mulheres que tinham problema tubário irreparável hoje sua indicação tem se expandido.

A FIV é mundialmente aplicada e considerada como a mais efetiva. É um dos tratamentos mais utilizados para infertilidade. Acredita-se que 1% das crianças nascida no Estados Unidos resultam da aplicação da FIV (FERRARETI, 2009).

Essa técnica é indicada para casos onde a infertilidade é de causa feminina, masculina ou inexplicável. Como na inseminação intrauterina, antes do procedimento o sêmen passa por procedimento de capacitação e seleção dos espermatozoides (FERRARETI, 2009).

2.2.9 Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Em 1992 Palermo e colegas descobriram que a injeção de um único espermatozoide dentro de um óvulo podia gerar embriões viáveis, revolucionando o campo da reprodução assistida. Essa técnica (ICSI) permitiu que homens com infertilidade intratável, por qualquer motivo, pudessem gerar seus próprios descendentes (OEHNINGER, 2011).

Os resultados da ICSI levaram a rápida adoção desta técnica em todo o mundo sendo indicada para casos onde havia infertilidade masculina severa e também por casais em que FIV tinha falhado (OEHNINGER, 2011).

A utilização da ICSI tem se tornado o método mais empregado para a fertilização do óvulo. Nos Estados Unidos e na Europa a ICSI foi a técnica de TRA escolhida em, respectivamente, 64% e 63% dos casos em que foram realizado fertilização *in vitro* (OEHNINGER, 2011).

Atualmente, com o retumbante sucesso da ICSI o número de casais que permanecem sem obter gravidez com seus próprios gametas é de somente 4% (KARPMAN, 2005).

2.3 ÁGUA DE COCO

2.3.1 A importância econômica da água de coco

O coqueiro é uma planta da espécie *Cocos nucifera* L. e família Palmae, com ocorrência na Ásia, África, América Latina e região do Pacífico. É cultivada em aproximadamente 11,6 milhões de hectares em 86 países. A sua importância na grande maioria dos países se deve ao seu papel econômico e nutricional (SIQUEIRA, 2002).

Essa planta não existia no Brasil no momento do descobrimento pelos portugueses. O coqueiro foi introduzido pela primeira vez no Brasil em 1553, no Estado da Bahia, sendo procedente das ilhas de Cabo Verde (SIQUEIRA, 2002).

Por muitos é considerado a árvore da vida por ser considerado um dos principais recursos vegetais da humanidade. Dele tudo se aproveita raiz, caule, folhas e fruto (VIGLIAR, 2006).

O fruto é composto de casca, mesocarpo e o endocarpo. A água de coco é o líquido contido dentro do endocarpo e que começa a se formar dois meses após a polinização da flor feminina (VIGLIAR, 2006).

A espécie *Cocos nucifera* L. é composta de duas variedades principais: Gigante e Anã. Há também uma variedade híbrida resultante do cruzamento entre essas espécies (ARAGÃO, 2001).

A variedade anã tem um potencial de produção maior que a gigante e de que o híbrido em termos de número de frutos/planta/ano, podendo atingir, em média, mais de 200 frutos/planta/ano em condições edafoclimáticas ótimas e com o uso de tecnologias adequadas para a cultura. Hoje, no Brasil, a sua cultura ocupa uma área de aproximadamente 27 mil hectares, distribuídos nas Regiões Nordeste, Norte, Centro-Oeste, Sudeste e, em menor escala, na Região Sul, principalmente no Estado do Paraná (RIBEIRO, 1999).

O coqueiro anão constitui-se na variedade de coqueiro mais utilizada comercialmente no Brasil para obtenção da água-de-coco, podendo ser empregada também na agroindústria de alimentos e/ ou do fruto seco in natura em menor escala (ARAGÃO, 2001).

A água de coco é o líquido do endosperma encontrado dentro da cavidade do coco e de acordo com pesquisas, corresponde a 25% do peso do fruto

e sua composição básica é de 95,5% de água, 4% de carboidratos, 0,1% de gordura, 0,02% de cálcio, 0,01% de fósforo, 0,5% de ferro, além de aminoácidos, vitamina C, vitaminas do complexo B e sais minerais (VIGLIAR, 2006).

A água de coco corresponde a aproximadamente 25% do peso do fruto. Na sua composição básica encontram-se 93% de água, 5% de açúcares, além de proteínas, sais minerais, eletrólitos e vitaminas. É pouco calórica e apresenta, em média, 20 calorias/100 ml (ARAGÃO, 2001).

O pH da água de coco varia com a idade do fruto em média. Na idade de cinco meses o pH está entre 4,7 e 4,8 elevando para 5 até o final do crescimento do fruto (ARAGÃO, 2001).

Devido a sua composição, a água de coco pode ser empregada na reidratação oral após práticas esportivas ou quadros patológicos que levam a desidratação como as síndromes diarreicas.

Em situações emergenciais e na falta de ambiente hospitalar a água de coco pode ser utilizada com hidratação endovenosa (PETRONIAU, 2004).

2.3.2 Água de coco e reprodução animal

O processamento do sêmen necessita do uso de diluentes que mantenham as células espermáticas com qualidade que as tornem aptas a fertilização. A água de coco apresenta características que a classificam como um bom meio de conservação seminal. Na área da biotecnologia da reprodução tem sido utilizada com sucesso em várias espécies, tais como: suínos, caprinos, bovinos, caninos, macacos e humanos (BARROS, 2011).

Em um estudo comparando o uso de água de coco em pó preparada para uso em sêmen de cachorros (ACP-106) com um diluente à base de água de coco fresca, Cardoso *et al.* (2005) observaram em todos os estágios do experimento que não houve diferença estatística entre motilidade e vitalidade dos espermatozoides em relação ao meio padrão e concluíram que a ACP-106 pode ser usada com sucesso na criopreservação de sêmen canino.

2.3.3 Água de coco em pó

Salgueiro *et al.* (2002) desenvolveram um produto à base de água de coco que pode representar uma alternativa para a difusão de várias biotecnologias. O produto básico (líquido endospérmico do coco), em sua forma processada é preparada na forma de pó (Quadro 2), confere estabilidade e longevidade de prateleira, sem problemas de acondicionamento, e supera toda e qualquer 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).

Quadro 2 – Composição da água de coco em pó, em 100 g

ACP (água de coco em pó) por 100g	
Caloriais (kcal)	378
Caloriais (kJ)	1585
Calorias de Carboidratos (kcal)	372
Calorias de Lipídios (kcal)	3
Calorias de Proteínas (kcal)	4
Carboidrato, por diferença (g)	93,00
Amido (g)	0,00
Frutose (g)	50,02
Galactose (g)	0,00
Glicose (g)	34,97
Lactose (g)	0,00
Maltose (g)	0,00
Sacarose (g)	3,00
Tanino (mg)	0,00
Proteína (g)	0,90
Gorduras totais (g)	0,300
Gorduras saturadas (g)	0,000
4:0 ácido butírico (g)	0,000
6:0 ácido capríco	0,000
8:0 ácido caprílico (g)	0,000
10:0 ácido cáprico (g)	0,000
12:0 ácido láurico (g)	0,000
14:0 ácido mirístico (g)	0,000
16:0 ácido palmítico (g)	0,000
18:0 ácido esterárico (g)	0,000
<i>Gorduras monoinsaturadas (g)</i>	<i>0,000</i>
16:1 ácido palmitoléico (g)	0,000
18:1 ácido oléico (g)	0,000
20:1 ácido gadoléico (g)	0,000
22:1 ácido erúico (g)	0,000
<i>Gorduras polinsaturadas (g)</i>	<i>0,000</i>

18:2 ácido linoléico (g)	0,000
18:3 ácido linolênico (g)	0,000
18:4 ácido estearidônico (g)	0,000
20:4 ácido araquidônico (g)	0,000
20:5 n-3 ácido eicosapentaenóico (g)	0,000
22:5 n-3 ácido decosapentaenóico (g)	0,000
22:6 n-3 ácido docosahexaenóico (g)	0,000
Gorduras trans (g)	0
Colesterol (mg)	0,00
Fibra, total alimentar (g)	4,30
Fibra (g)	-
Fibra Alimentar Insolúvel (g)	4,10
Fibra Alimentar Solúvel (g)	0,20
Acidez total (mL de NaOH 1 N)	0,2 (Ác. Acético)
Umidade (g)	3,00
Cinzas (g)	1,30
Sólidos Totais (g)	97,01
MINERAIS	
Sódio, Na (mg)	105,000
Cálcio, Ca (mg)	39,000
Ferro, Fe (mg)	0,300
Cobre, Cu (mg)	0,000
Fósforo, P (mg)	45,200
Magnésio, Mg (mg)	25,000
Manganês, Mn (mg)	1,100
Potássio, K (mg)	250,000
Selênio, Se (mg)	0,000
Zinco, Zn (mg)	0,000
Cloreto (mg)	-
Cromo (mcg)	0,000
Iodo (mcg)	0,000
Molibdênio (mg)	-
VITAMINAS	
Vitamina A (mcg) RAE, retinol	0,00
Vitamina B1 (mg), tiamina	0,17
Vitamina B2 (mg), riboflavina	0,00
Vitamina B3 (mg), niacina (ácido nicotínico e vitamina PP)	0,12
Vitamina B5 (mg), ácido pantotênico	6,51
Vitamina B6 (mg), piridoxina	0,00
Vitamina B12 (mcg), cobalamina	0,22
Ácido Fólico (mcg)	312,00
Vitamina C (mg), ácido ascórbico	26,80
Vitamina D (mcg), calciferol	1,50
Vitamina E (mg), d-alfa-tocoferol	0,00
Vitamina K (mcg), K1-filoquinona, Vitamina H, Biotina	0,00
Biotina	8,03
Carotenos, alfa (mcg)	-
Carotenos, beta (mcg)	-
Colina, total (mg)	-
Folatos, total (mcg)	-
AMINOÁCIDOS	
Ácido Aspártico (mg)	0,700000

Ácido Glutâmico (mg)	172,000000
Alanina (mg)	38,600000
Arginina (mg)	126,000000
Cistina (mg)	14,800000
Fenilalanina (mg)	38,000000
Glicina (mg)	36,400000
Glutamina (mg)	172,000000
Histidina (mg)	17,800000
Isoleucina (mg)	29,300000
Leucina (mg)	54,200000
Lisina (mg)	33,100000
Metionina (mg)	14,000000
Prolina (mg)	32,000000
Serina (mg)	39,000000
Tirosina (mg)	24,000000
Treonina (mg)	28,200000
Triptofano (mg)	8,400000
Valina (mg)	48,000000
Osmolaridade (mOsm/Kg H ₂ O; 10g em 100 ml)	210
Grau de saturação em água g/ml	0,8

Fonte: ACP Biotecnologia (2015)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade da amostra seminal humana preparada com uso de ACP-113up como meio diluente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os parâmetros espermáticos (quantidade, motilidade e vitalidade de amostras preparadas com ACP-113up com amostras preparadas com meio padrão;
- Determinar in vitro a vitalidade dos espermatozoides diluídos em água de coco em pó comparando ao diluidor padrão utilizado corriqueiramente na atualidade;
- Proceder uma análise econômica da relação custo/benefício da água de coco em pó em comparação aos diluidores padrões.

4 METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unichristus, sob nº 51301415.8.0000.5049. Nos meses de janeiro e fevereiro de 2016 amostras normozoospérmicas de 50 voluntários foram colhidas em uma Clínica de Reprodução Humana, através de masturbação, após um período de abstinência que variou entre dois e cinco dias.

As análises do sobrenadante do *swim-up* foram comparadas grupo a grupo (Tab. 1). Os parâmetros analisados foram: concentração ([sptz]/ml); motilidade total (motilidade A + motilidade B; %); e morfologia total (segundo critério de Kruger). As alterações na morfologia foram classificadas em alterações de cabeça (%), de acrossoma (%), e de três segmentos do espermatozoide: acrossoma (A), cabeça (C), peça intermediária (PI), e flagelo (F) ou em todos os segmentos (A +C+PI+F). Foi utilizado o teste estatístico de Mann-Whitney para avaliação de variáveis não paramétricas.

As amostras foram incubadas e mantidas aquecidas a 37 °C até sua liquefação. Em seguida, realizou-se Análise Seminal Padrão conforme a 5ª edição do Manual de Processamento do Sêmen Humano da Organização Mundial da Saúde (2010).

Utilizou-se os seguintes meios:

- PBS (*Phosphate Buffered Saline Solution*; Irvine Scientific, USA);
- HTF (*Human Tubal Fluid*; Irvine Scientific, USA); e
- ACP-113up (meio à base de água de coco em pó; ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará; pH 7,34; 300 mOsm/Kg H₂O).

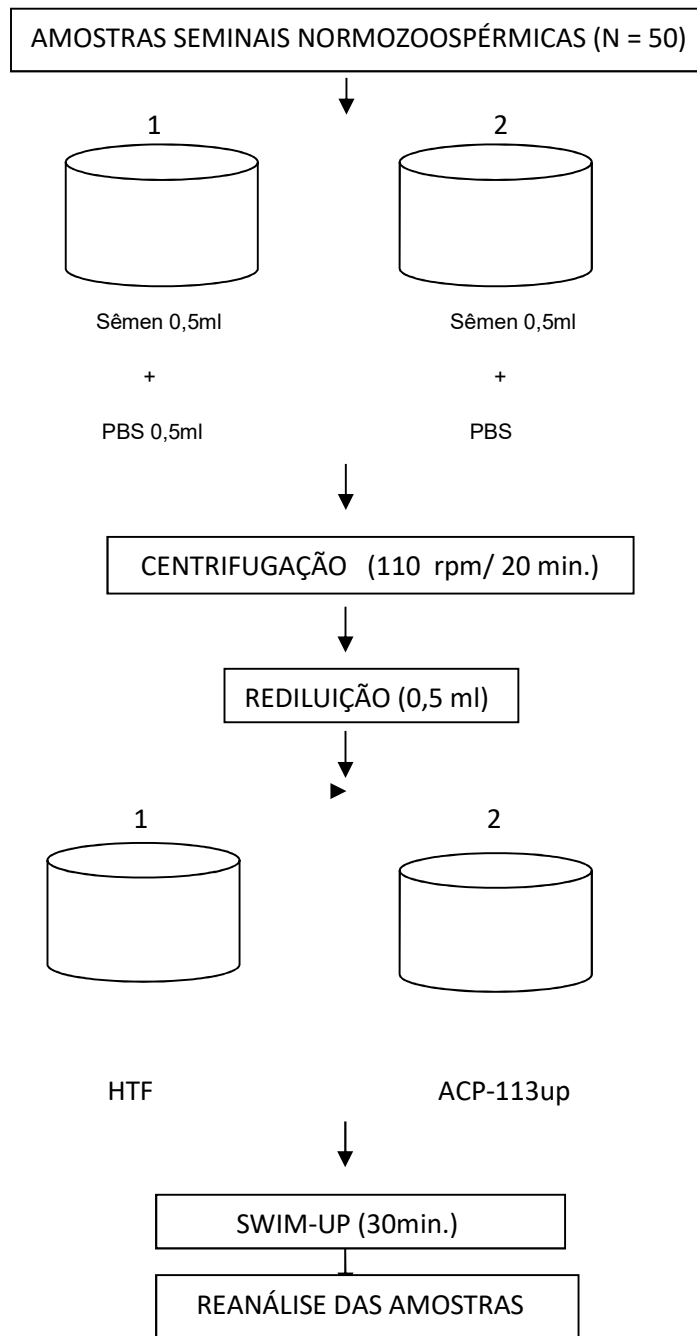
A avaliação seminal foi realizada em dois momentos: (1) Lavagem seminal; e (2) *Swim up*.

Lavagem seminal:

Cada amostra liquefeita foi dividida em duas frações iguais de 0,5 ml e dispensadas em tubos de ensaio e adicionadas de 0,5 ml de PBS (tubo 1) e 0,5 ml de ACP-113up (tubo 2). Os tubos foram então centrifugados a 110 rpm por 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado restando em cada tubo apenas o sedimento (pellet).

Swim up:

Ao sedimento (pellet) de cada tubo foram adicionados 0,5 ml de HTF (tubo 1) e 0,5 ml de ACP-113up (tubo 2). Os tubos foram inclinados a 45°, aquecidos a 37 °C e, após 60 min., o sobrenadante foi aspirado e foi procedida a análise da concentração e motilidade dos espermatozoides que nadavam para a parte de cima do meio de cultura. A morfologia pelo critério estrito de Kruger.



No estudo, foram formados os seguintes Grupos Experimentais:

GC = Grupo Controle (sêmen fresco);
 G1 = Grupo 1 (padrão ouro; lavagem com PBS e *swim up* com HTF)
 G2 = Grupo 2 (lavagem com PBS e *swim up* com ACP-113up)

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *software* estatístico SPSS v23. Os parâmetros descritivos das análises seminais foram expressos a partir de suas medianas. As diferenças entre os grupos em relação aos parâmetros do sêmen fresco foram avaliadas pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que as variáveis têm distribuição não normal. Foram realizados então os testes de Mann-Whitney para avaliação da significância estatística das diferenças encontradas. Foi considerado significativo valores de p menores que 0,05.

5 RESULTADOS

Dentre os cinquenta participantes da pesquisa, a idade média foi de 29,5 anos. Trinta (62,5%) se declararam pardos. Vinte e seis (52%) eram solteiros. O índice de massa corpórea (IMC) médio dos voluntários foi de 25,56 kg/m².

Dentre os hábitos pesquisados, 31 (62%) declararam realizar algum tipo de atividade física regularmente e apenas 4 (8%) eram tabagistas. O consumo recreativo de álcool, entretanto, foi admitido por 30 (60%) dos participantes.

Dentre as variáveis relacionadas à coleta, destacaram-se a perda de conteúdo seminal no momento da coleta, relatada por 6 (12%) dos envolvidos e o tempo médio de abstinência de três dias, variando de um a sete dias.

O volume médio de sêmen coletado foi de 3 ml. Todas as amostras avaliadas apresentaram coloração característica (branca). A viscosidade e a consistência foram consideradas normais em 68% (n=34) e 64% (n=32) das amostras, respectivamente.

Definiu-se que a lavagem da amostra com PBS e a realização do *swim up* com HTF seria grupo 1 (padrão ouro), o controle, com o qual os demais grupos foram comparados. No estudo comparou-se o resultado do *swim up* do grupo 2 com o padrão (tabela 1).

Tabela 1 - Mediana de parâmetros espermáticos de amostras lavadas com PBS, centrifugadas e rediluídas com HTF ou ACP-113up e submetidas à técnica de *swim up*

Parâmetros espermáticos	GC (sêmen fresco)	G1 (PBS + HTF)	G2 (PBS + ACP)
[sptz]/ml	64,00	25,50	15,00 ^a
Mot A+B (%)	68,35	85,85	75,40 ^b
Sptz Morf Nor (%)	2,00	3,00	3,00
Alt Cab (%)	14,00	19,00	16,00
Alt Acros (%)	0,00	2,50	2,00
Sptz def (C+A+PI / C+A+F / A+PI+F / C+PI+F)	27,00	26,50	25,00
Sptz def (C+A+PI+F)	13,00	11,00	11,50

Fonte: Próprio autor.

GC = grupo controle (sêmen fresco); G1 = grupo 1 (lavagem com PBS + *swim up* com HTF); G2 = grupo 2 (lavagem com PBS+ *swim-up* com ACP-113up). [sptz]/ml = concentração espermática por mililitro; Mot A + B = porcentagem de espermatozoides com motilidade A + B, ou seja, com trajetória retilínea; Sptz Morf Nor = porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais; Alt Cab = porcentagem de alterações de cabeça totais; Alt Acros = porcentagem de alterações de acrossoma; Sptz def = espermatozoides com defeito; C = cabeça; A = acrossoma; PI = peça intermediária; F = flagelo. ^a p < 0,005; ^b p < 0,05.

A análise do resultado do *swim up* revelou que a concentração e motilidade dos espermatozoides recuperados na amostra padrão (PBS/HTF) foi superior aos obtidos pela amostra comparativa (PBS/ACP) ($p < 0,05$).

Observa-se na tabela 1 que o *swim up* do grupo padrão separou espermatozoide em maior quantidade e com melhor motilidade do que o grupo 2. Em contrapartida, o grupo 2 separou um maior número de espermatozoides com morfologia normal.

6 DISCUSSÃO

A infertilidade conjugal é definida como a incapacidade de um casal obter sucesso em engravidar após um ano de relações sexuais regulares desprotegidas. Esta condição afeta aproximadamente 15% dos casais em todo o mundo e as alterações na fertilidade masculina estão envolvidas em 50% dos casos. A OMS estima que há entre 60 e 80 milhões de casais sofrendo de infertilidade no mundo (BACHIR, 2014).

O homem é considerado infértil quando não consegue engravidar uma mulher saudável. Entre as várias causas que podem levar a infertilidade masculina se incluem malformações congênitas, exposição a toxinas ambientais, varicocele, alterações genéticas, desordens endocrinológicas, infecciosas e inflamatórias entre outras (BACHIR, 2014).

Os problemas masculinos são responsáveis isoladamente pela infertilidade conjugal em aproximadamente 20% dos casos. Estes problemas contribuem para infertilidade em outros 30 a 40% dos casais. A infertilidade masculina é frequentemente diagnosticada pelas alterações nos parâmetros seminais mas pode estar presente mesmo com a amostra seminal normal (PRACTICE COMMITTEE, 2002).

Para os 15% dos casais que são considerados inférteis, o emprego das técnicas de reprodução assistida pode ser a única alternativa para se obter filhos biológicos. Entre essas técnicas estão a inseminação artificial, fertilização *in vitro* e a injeção intracitoplasmática de espermatozoide.

Essas técnicas têm mudado dramaticamente o tratamento da infertilidade conjugal. Os melhores resultados no tratamento dos casais inférteis não seriam possíveis sem o concomitante avanço na manipulação e preparação dos espermatozoides. Pesquisas andrológicas têm buscado uma melhor compreensão da fisiologia do espermatozoide e desenvolvido novas técnicas para selecionar os melhores gametas (MEHTA, 2014).

O plasma seminal além de proteger é fonte de energia para os espermatozoides. Porém, a exposição ao plasma seminal por tempo prolongado pode diminuir a capacidade fértil dos espermatozoides. As técnicas de reprodução assistida têm em comum a necessidade de separar os espermatozoides dos outros componentes do sêmen. Os métodos convencionais empregados nesse processo

podem ser classificados como métodos baseados em migração, gradiente de densidade e filtração. Além de separar, esses métodos visam obter um maior número de espermatozoides móveis. Em todas esses métodos se utiliza um meio de cultura com a finalidade de proteger e nutrir os espermatozoides (HENKEL, 2012; MEHTA, 2014).

Em processos tecnológicos de reprodução assistida, o desenvolvimento de um meio de cultura que mantenha a viabilidade da célula espermática por um período maior de tempo é uma alternativa importante para a tecnologia da conservação do sêmen de diversas espécies. Em virtude das características da água de coco, ela vem demonstrando um grande potencial na conservação da célula espermática em diversas espécies de animais domésticos, como os suínos (TONIOLLI, 1989), ovinos e caprinos (NUNES; SALGUEIRO, 1999).

Dentre os diversos meios de cultura de sêmen não importados e de baixo custo já testados no Brasil, a água de coco, após correção da osmolaridade e do pH, vem demonstrando, por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*, resultados positivos na manutenção da viabilidade e poder fecundante dos espermatozoides, sendo possível sua utilização em processos biotecnológicos, como a inseminação artificial, sem os custos elevados com diluentes importados (NUNES, 1998).

A água de coco *in natura* foi testada como diluente alternativo e comparada ao leite desnatado na avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis e motilidade progressiva do sêmen ovino, em diferentes períodos de incubação em banho-maria a 37 °C. Embora ambos os diluentes tenham demonstrado resultados satisfatórios na conservação da célula espermática, a água de coco se mostrou mais eficiente na manutenção das características avaliadas (NUNES, 1997).

A água de coco, *in natura* foi utilizada como diluente para o sêmen suíno e avaliada quanto à sua ação sobre a viabilidade espermática, sendo comparada ao diluente tradicional BTS (controle). A água de coco *in natura* apresentou médias superiores de motilidade progressiva em relação ao diluidor BTS, aos 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação a 37 °C, podendo ser esta uma alternativa tecnológica para o seu emprego na conservação do sêmen da referida espécie (TONIOLLI, 1998).

Entretanto, o uso da água de coco *in natura* apresenta problemas, tais como perenidade reduzida e impossibilidade de se estocar o fruto por longos

períodos, sendo sua utilização limitada às regiões onde esse fruto é encontrado (CARDOSO, 2005).

Com o intuito de solucionar as limitações da água de coco *in natura*, Salgueiro et al através da técnica de spray dry, método que produz um pó seco a partir de um líquido mediante rápida secagem com um gás quente, obtiveram a água de coco em pó (SALGUEIRO, 2002).

A água de coco em pó foi desenvolvida com o intuito de simplificar a utilização da água de coco como diluente e observou-se que após sua ressuspensão, ela apresenta características bioquímicas muito similares àquelas encontradas no fruto *in natura*. Além disso, a água de coco em pó pode ser facilmente armazenada e enviada para regiões onde o coco não é encontrado (SALGUEIRO, 2002; CARDOSO, 2005).

Ao ser utilizada como diluente de sêmen para a espécie de capote *Numida meleagris*, submetendo o sêmen a diferentes temperaturas (4 e 15 °C), e comparada a um diluente comercial já utilizado para esta espécie, para todos os parâmetros avaliados, o diluente à base de água de coco em pó a 4 °C apresentou melhor desempenho em todos os tempos de conservação. No entanto, mesmo à temperatura de 15 °C, os resultados permaneceram acima dos valores mínimos recomendados para a inseminação artificial, resultado também observado para o diluente-controle, o que indica que a água de coco em pó pode ser utilizada para a conservação do sêmen de capotes (RONDON *et al.*, 2008).

Avaliações *in vitro* e *in vivo* foram realizadas após a conservação do sêmen de suíno diluído em água de coco em pó e BTS, um diluente já utilizado amplamente para a espécie suína. Nesse trabalho, as avaliações de vigor (4,1) e porcentagem de espermatozoides móveis (91%) ficaram acima dos valores exigidos (3,0 e 70%) para a utilização do sêmen de suíno em programas de inseminação artificial, e todas as análises foram superiores às obtidas a partir do diluente BTS (TONIOLLI, 2010).

Com a evolução das técnicas de reprodução assistida a criopreservação de sêmen está sendo cada vez mais utilizada, já que permite o transporte de material genético, tanto dentro do país como entre países. A água de coco em pó foi utilizada como meio diluente no processo de criopreservação de sêmen do gato doméstico nas etapas de diluição, resfriamento e glicerolização, e em todas estas etapas testadas a água de coco em pó mostrou-se eficiente na manutenção da boa

qualidade espermática, com as médias de motilidade e vigor superiores a 70% e 3,5, respectivamente, sendo esses dados compatíveis com sua utilização em programas de inseminação artificial (SILVA, 2007).

No estudo ora relatado foi empregado, para recuperação dos espermatozoides, um método baseado em migração, o *swim up*. Este método é o mais utilizado nas clínicas de reprodução humana por sua simplicidade e rapidez. No entanto quando os seus resultados são comparados com o gradiente de concentração, o *swim up* recupera um menor número de espermatozoides. Uma das razões para essa diferença é a dificuldade que os espermatozoides, que se encontram concentrados em um pellet no fundo do tubo de ensaio após a centrifugação, têm de se desvencilharem e nadarem até a superfície do meio de ressuspensão. Devido a esse problema, o *swim up* é indicado em amostras normozoospérmicas.

Ao comparar-se os resultados obtidos observa-se que o *swim up* com ACP-113up recuperou um menor número de espermatozoides móveis em relação ao meio padrão. Essa redução teve impacto estatístico. Apesar disso, os valores obtidos não inviabilizariam o uso da amostra em técnicas de reprodução humana assistida tanto a inseminação artificial intrauterina quanto a fertilização *in vitro*.

Com relação ao parâmetro morfologia os resultados do *swim up* com ACP-113up foram melhores do que os do grupo padrão, recuperando espermatozoides com formas normais em uma taxa ligeiramente melhor (não houve significância estatística). Especificamente espermatozoides com alterações de cabeça foram mais presentes no grupo padrão. Os espermatozoides recuperados que apresentavam alterações em todos os segmentos (cabeça, acrossomo, peça intermediária e cauda) também foram superiores no grupo padrão.

A recuperação de espermatozoides com menores danos na cabeça e no acrossoma obtidos no *swim up* com ACP-113up, sugere que esses espermatozoides são funcionalmente melhores e portanto, com maior poder de fertilização do oócito.

No nosso Estado o meio de cultura padrão é adquirido pelas clínicas de reprodução assistidas pelo valor aproximado de R\$ 600,00 em recipientes contendo 100ml. Para cada procedimento de reprodução assistida se utiliza 5,0 ml do meio. Consegue-se, portanto, realizar 20 procedimentos ao custo unitário de R\$ 30,00.

A água de coco em pó é disponibilizada em sachês ao custo de R\$ 10,00 que após ser diluída originará 50ml de meio. O valor por procedimento com o emprego da água de coco é de R\$ 1,00.

A significativa diferença de valores entre o emprego do meio padrão e a água de coco em pó demonstra que economicamente o procedimento realizado com a água de coco em pó é trinta vezes mais barato.

7 CONCLUSÃO

Esse estudo é pioneiro na utilização de água de coco na manipulação de gametas masculinos com o propósito de utilizá-los em técnicas de reprodução assistida. Por ser um produto natural e de baixo custo, a água de coco em pó pode ser uma alternativa aos meios industrializados e importados.

O estudo mostra que o uso da água de coco em pó como meio diluente empregada na manipulação dos espermatozoides se mostrou mais eficiente do que os meios utilizados de forma padrão quando se analisa o parâmetro morfologia espermática.

A água de coco pode ser uma alternativa em amostras com número de espermatozoides normais principalmente se ela se mostrar deficiente morfologia.

Economicamente a água de coco em pó tem um custo trinta vezes menor do que o meio artificial utilizado rotineiramente nas clínicas de fertilização. O barateamento do processo de reprodução assistida pode torná-lo mais acessível a um maior número de casais principalmente em países do 3º mundo como o Brasil.

A sua formulação em pó contornou várias limitação da forma in natura tais como perenidade, estocagem, padronização podendo ser disponibilizada em lugares onde não há cultivo dessa planta.

Estudos são necessários avaliando a performance da água de coco em pó nas amostras seminais onde alterações morfológicas estejam presentes como a principal anormalidade. Além disso, estudos complementares avaliando a funcionalidade desses espermatozoides tanto no se refere a taxa de fertilidade e gravidez necessitam ser realizados.

REFERÊNCIAS

- ALLAMENENII, S. S. *et al.* Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v. 7, n. 1, p. 86-92, 2005. doi: 10.1111/j.1745-7262.2005.00008.x
- ALMEIDA, R.; SOARES, A. E. E. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; HYMENOPTERA: APOIDEA). **Interciencia**, v. 27, n. 6, p. 317-21, 2002.
- ALMEIDA, V. M. Biotecnologia em reprodução humana assistida. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 21, p. 505-8, 2005.
- ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. O. **Água-de-coco**. Aracaju: Embrapa CPATC/ Tabuleiros Costeiros, 2001. (Série Documentos 24).
- ARAGÃO, W.M. (Ed.) **COCO: pós-colheita**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 76 p. il.; color (Frutas do Brasil, 29), 2002.
- ARAÚJO, A. A. **Utilização da água de coco “in natura” com adição de gema de ovo como diluidor do sêmen caprino**. Fortaleza, 1990. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 1990).
- AUGER, J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? **Asian Journal of Andrology**, v. 12, p. 36-46, 2010.
- BARROS T. B. *et al.* Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 400-7. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n4/pag%20400-407.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2017.
- BASTOS, H. I. G. et al. The effect of a natural solution of coconut water on the macrophage cultures: a morphological analysis. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 12, p. 1437-43, 2008.
- BEARER, E. L.; FRIEND, D. S. Modifications of anionic lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. **Journal Cell Biology**, v. 92, p. 604-15, 1982.
- BLESBOIS, E.; SOUSA, F.M.; GRASSEAU, I. Effects of 3-indole acetic acid (IAA) on the storage at 4 °C of fowl sperm. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS, 20., 1996, New Delhi. **Proceedings...** New Delhi: WPC, 1996.
- BLOOM, W.; FAWCETT, D. W. **Male Reproductive System**. In: A Textbook of Histology, 1986. p.796-849.

BOIVIN, J. *et al.* International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1506-12, 2007.

BONDE, J. P. E. Semen analysis from an epidemiologic perspective. **Asian Journal of Andrology**, p. 91-4, 2010.

CABRAL, L. M. C.; PENHA, E. M.; MATTA, V. M. **Água de coco verde refrigerada**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.34.

CAMPOS, C.F. *et al.* Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of Green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20 p. 487-500, 1996.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 257-62, 2005. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v2n4/Use%20of%20the%20powdered.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 384-91, 2006.

CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; KUBOTA, L. T. Simultaneous determination of calcium and potassium in coconut water by a flow-injection method with tubular potentiometric sensors. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 225-30, 2006.

COETZEE, K.; KRUGE, T. F.; LOMBARD, C. J. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 73-82, 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622414>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

COFFEY, D. **What is the prostate and what is its function?** In: ROBAIRE, B; PRYOR, J.L.; TRASLER, J. M. (eds). Handbook of Andrology. Lawrence, Kans: Allen Press Inc; 1995:21–24.

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

CUPPS, P. T. **Espermatogenesis**. In: Reproduction in domestic animals, 4 ed., San Diego, California. Chapter 5, p. 174-220, 1991.

DUARTE, A. C. P.; COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F. Identification of peroxidase and tyrosinase in Green coconut water. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**. v. 3 n. 5 pp. 266-270. 2002.

ESTEVEES, S. C. *et al.* What every gynecologist should know about male infertility: an update. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 286, p. 217-29, 2012. doi: 10.1007/s00404-012-2274-x

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

FERNANDES, J. C. B. *et al.* Simultaneous determination of chloride and potassium in carbohydrate electrolyte beverages using an array of ion-selective electrodes controlled by a microcomputer. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 349-54, 2000.

FIGUEIREDO, H. *et al.* Isolated teratozoospermia and in vitro fertilization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 13, p. 64-8, 1996. doi: 10.1007/BF02068872

FLESCH, F. M; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FONSECA, A. M. *et al.* Coconut water (*Cocos nucifera* L.) – A new biocatalyst system for organic synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. doi: 10.1016/j.molcatb.2008.06.022. 2008.

FRANKEN, D. R.; AVARI, K.; PALSHEKAR, N. Morphology training is compulsory to ensure relevant clinical results. **Andrologia**, v. 40, p.377-380, 2008.

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

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

GE, L. *et al.* Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1133, p. 322-31, 2006.

HENKEL, R. R.; SCHILL, W-B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 108, 2003.

HOTALING, J. M. *et al.* The relationship between isolated teratozoospermia and clinical pregnancy after in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. **Fertility & Sterility**, v. 95, p. 1141-5, 2011. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.029

JACKSON, J. C. *et al.* Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 9, n. 84, p. 1049-1052, 2004.

JAMEEL, T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 58, n. 2, p. 71-4, 2008.

KAMEL, R. M. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 21-8, 2010. doi: 10.1186/1477-7827-8-21

KHAN, M. N.; MUTI, U. R.; KHAN, K. W. A study of chemical composition of *Cocos nucifera* L. (coconut) water and its usefulness as rehydration fluid. **Pakistan Journal of Botany**, v. 35, n. 5, p. 925-30, 2003.

KIM, E. K. *et al.* Comparison of the effect of different media on the clinical outcomes of the density-gradient centrifugation/swim-up and swim-up methods. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 42, p. 22-9, 2015. doi: 10.5653/cerm.2015.42.1.22

KRUGER, T. F. *et al.* New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. **Urology**, v. 30, p. 248-51, 1987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3629768>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

LOPES, S. *et al.* Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. **Fertility & Sterility**, v. 69, n. 3, p. 528-32, 1998.

LUNDIN, K.; SODERLUND, B.; HAMBERGER, L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection program. **Human Reproduction**, v. 12, n. 12, p. 2676-81, 1997.

LUNDIN, K.; SÖDERLUND, B.; HAMBERGER, L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection program. **Human Reproduction**, v. 12, p. 2676-81, 1997. Disponível em: <https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/humrep/12/12/10.1093_humrep_12.12.2676/1/122676.pdf?Expires=1491500431&Signature=gONxQB6Ve6AuwLXIJFZPLS7JeIJTCxq2D8cOReNwA6VIY~g5alOmogg86T1AwKnZOPpn7I6KXwx854d0koRg~gZoCi~cbEsbLnixZ5UdwHXkY3r~ewjcc6GFPUXUCeohCyc2euV0jldO6br-ig6HguK2rRxJM5YPEJUhhc-gwbvH79q0czqvYTCwcJorxajuYQoK2Pdf4o-VnO0HFjq3f2IHVCNRYsOFLke1iRNZ53JPtVF6iGOMif2WyEbKJ9Fx4silOcGiRLtFcgKLIZN-5uDhaZp7HTjJlByggfGCSfrqa1-mjVyHqdA189-ugcAZm6hvxDOwGUYfiLakThtXNHuuA__&Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPAVW3Q>. Acesso em: 02 abr. 2017.

MAGALHAES, M. P. *et al.* Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 72-7, 2005.

MEHTA, A.; SIGMAN, M. Identification and preparation of sperm for ART. **Urologic Clinics of North America**, v. 41, p. 169-80, 2014. doi: 10.1016/j.ucl.2013.08.005

MENKVELD, R.; KRUGER, T.F. Sperm morphology – predictive value? **Fertility and Sterility**, v. 67, p. 942, 1992.

MILARDI, D. *et al.* Clinical study male fertility and reduction in semen parameters: a single tertiary-care center experience. **International Journal of Endocrinology**, 2012.

MONTEZUMA Jr., P. A.; VIANA NETO, R.; NUNES, J. F. Utilização da água de coco “in natura”, com adição de gema de ovo, como diluente de congelamento do sêmen canino, em pallets de 0,5 ml. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., **Anais...** Olinda, p.535, 1994.

MORAES, G. E. S. **Aparelho Reprodutor Masculino**. In: *Espermocitologia: espermocitograma em critério estrito*. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2007. cap. 1, p. 13-58.

MOREIRA-NETO, J. J. S. *et al.* Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 9, p. 827-30, 2009.

NATALI, I. Sperm preparation techniques for artificial insemination - Comparison of sperm washing, swim up, and density gradient centrifugation methods. In: MANAFI, M. **Artificial insemination in farm animals**, cap. 7 (Intech), 2011. doi: 10.5772/17026.

NG, F. L.; LIU, D. Y.; BAKER, H. W. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. **Human Reproduction**, v. 7, n. 2, p. 261-6, 1992.

NIESCHLAG, E.; LENZI, A. The conventional management of male infertility. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 123, p. S31-S35, 2013. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.09.001

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, 1., **Anais...** Fortaleza, 1995, p. 57-63. 1995.

NUNES, J. F. *et al.* Utilização da água de coco e suas frações ativas na conservação in vitro e avaliação in vivo do sêmen na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 2, p. 34, 1996.

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

NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n. 43, supl, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen**. 5. ed. WHO Press: Geneva, 2010. Disponível em: <http://www.cnrha.msssi.gob.es/bioetica/pdf/semen_humano.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2017.

OWEN, D. H.; KATZ, D. F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, 2005.

PENN *et al.* National semen analysis reference range reporting: adherence to the 1999 World Health Organization guidelines 10 years later. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 7, 2011.

PETROIANU, G. A. *et al.* Green coconut water for intravenous use: trace and minor element content. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 17, n. 4, p. 273-82, 2004.

PFEIFER, S. *et al.* Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. **Fertility and Sterility**, v. 90, p. 560, 2008.

PFEIFER, S. *et al.* Diagnostic evaluation of the infertile male; a committee opinion. **Fertility and Sterility**, v. 103, p. 44-50 2015, doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.019

PINHEIRO, H. A. *et al.* Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, v. 96, n. 1, p. 101-8, 2005.

RODRIGUES, A.P.R. *et al.* Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como diluidores do sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., **Anais...** Olinda, p. 540, 1994.

SAKKAS, D. *et al.* The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. **Human Reproduction**, v. 15, n. 5, p. 1112-6, 2000.

SALGUEIRO, C. C. M. *et al.* Inseminação artificial de ovelhas com sêmen diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102) ou TRIS, resfriado e mantido a 4°C por 24 horas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Curitiba. **Anais ...** Curitiba, 2007. p.149.

SALLES, M. G. F. **Água de coco (Cocos nucifera L.) in natura e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor do sêmen caprino.** Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 54p. 1989.

SHERMAN J. **Cryopreservation of human semen.** In: CRC Press BR (ed.) Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. FL, USA; 1990.

SINGER, S. Y.; NICHOLSON, G. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-31, 1972.

SOUSA, N. M. *et al.* 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: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23. **Anais...** Olinda, p. 583, 1994.

SOUZA, F. M.; OLIVEIRA, A. C. Uso de diluidores alternativos para o sêmen de capote (*Numida meleagris*). In: REUNIÃO DE INICIAÇÃO À PESQUISA DA UECE, 1., **Anais...** Fortaleza, 1996. Fortaleza: UECE, p. 36-37, 1996.

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

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M.I.; CAVALCANTE, S.G. Avaliação in vitro do sêmen suíno em BTS e na água de coco in natura e estabilizada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.4, p. 198-201, 1998.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D. S. M. Fertility of sows inseminated with diluted semen in coconut water or B.T.S. extender. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 14, p. 249-54, 1990.

TOURNAYE, H. Male factor infertility and ART. **Asian Journal of Andrology**, v. 14, p. 103-8, 2012. doi: 10.1038/aja.2011.65

UCHÔA, D. C.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Artificial insemination with fresh semen in female Boxers using different extenders. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p. 150-152, 2002.

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

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-79, 2002.

VIGLIAR, R.; SDEPANIAN, V. L.; FAGUNDES-NETO, U. Perfil bioquímico da água de coco. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 308-12, 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.2223/JPED.1508>

VOLPES, A. *et al.* The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v. 33, p. 765-70, 2016. doi: 10.1007/s10815-016-0696-2

ZANEVELD, L. J. D.; SCHUMACHER, G. F. B. **Reproducción Humana**. Barcelona: Salvat ed., 1986. p. 123.

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

02/04/2017 ScholarOne Manuscripts

Reproduction, Fertility and Development

Home

Author

Review

Submission Confirmation Print

Thank you for your submission

Submitted to
Reproduction, Fertility and Development

Manuscript ID
RD17138

Title
Use of powdered coconut water in the dilution and preparation of spermatozoa used in assisted human reproduction techniques

Authors
Souza, Ivon
Mesquita, Francisco José
Silveira, Erika
Teixeira, Gabriela
Gomes, Larissa
Rocha, Hermano Alexandre
Nunes, José
Sales, Antonia
Salgueiro, Cristiane

Date Submitted
03-Apr-2017