



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL
EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL



JOSENILDO COSTA OLIVEIRA

EFEITO DO NUTRACÊUTICO A BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP®)
NA FERTILIDADE DE RATOS WISTAR

TERESINA – PIAUÍ

2022

JOSENILDO COSTA OLIVEIRA

EFEITO DO NUTRACÊUTICO A BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP®) NA
FERTILIDADE DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal-MPGBIOTEC do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Prospecção e desenvolvimento de bioprodutos

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria Zenaide de Lima Chagas Moreno Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

TERESINA – PIAUÍ

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Oliveira, Josenildo Costa.

Efeito do nutracêutico a base de água de coco em pó (acp®) na fertilidade de ratos wistar [recurso eletrônico] / Josenildo Costa Oliveira. - 2022.

73 f. : il.

Dissertação (MESTRADO PROFISSIONAL) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal Nível Mestrado, Teresina, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro.

Coorientação: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula., Prof^a. Dra. Maria Zenaide de Lima Chagas Moreno Fernandes.

1. Fertilidade. 2. Nutracêuticos. 3. ACP®..

JOSENILDO COSTA OLIVEIRA

EFEITO DO NUTRACÊUTICO A BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP®) NA
FERTILIDADE DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal-MPBIOTEC do centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Prospecção e desenvolvimento de bioprodutos

Aprovado em: 21 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro

Prof^a Dr^a Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro (Orientadora)
Universidade Federal do Piauí - UFPI



Prof^a. Dra. Maria Zenaide de Lima Chagas Moreno Fernandes
Universidade Federal do Piauí - UFPI



Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Waldilenny Ribeiro de Araújo Moura

Prof. ^a Dr.^a Waldilenny Ribeiro de Araújo Moura
Universidade Federal do Piauí - UFPI



Prof^a Dr^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Dedico esse projeto ao meu pai (João Luiz), in memoriam, que sempre me motivou a estudar e ter mestrado e doutorado.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Piauí que cedeu todo o espaço para que esse projeto acontecesse e a Universidade Estadual do Ceará que me proporcionou esse momento tão importante da minha vida. E o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (PPGBiotec) e a todos os professores que fizeram parte em especial ao prof. Dr. Fabrício Pires de Moura do Amaral e ao prof. Dr. Rômulo José Vieira. Meus agradecimentos sinceros vão para o Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula, responsável por tudo isso acontecer, além da sua paciência e dedicação. A Francisca Kelly e a Louis Henrique que estiveram comigo fazendo esse projeto acontecer me dando o suporte no que precisava. A Leticia Soares, a Marlene Sipaúba e a Clarissa de Castro que ajudaram naquilo que foi necessário nesse projeto. A Prof.^a Dr.^a Waldilleny Ribeiro de Araújo Moura que cedeu o espaço e ajudou a organizar o trabalho, ao Marcelo e a Esmeralda Lustosa que me ensinaram a cuidar e tratar os ratos, além do manuseio desses, a Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro e ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes que cederam o ACP[®] para que esse trabalho fosse possível, ao professor Dr. Jose Adalmir Torres De Souza que cedeu o laboratório onde foi feita a eutanásia, a Mariana de Lima e o João que estiveram ajudando na eutanásia e remoção dos órgãos e em outros momentos importante da pesquisa, sempre foram muito prestativos, a professora Dr.^a Silvia De Araujo Franca Baeta que ajudou nesse mesmo dia, a professora Dr.^a Janaina De Fatima Saraiva Cardoso que ajudou com as estatísticas e a todos do Laboratório LASAN. E ao biotério central da UFPI que cedeu os ratos. Prof.^a Dr.^a Larissa Maria Feitosa Gonçalves e ao Jackson por terem confeccionados as lâminas para análise histopatológico. Meu agradecimento especial vai para a Prof.^a. Dra. Maria Zenaide de Lima Chagas Moreno Fernandes que esteve presente desde o começo dessa ideia, e sempre teve uma grande paciência na organização desse projeto, além de ser uma pessoa inteligente e perspicaz. O maior agradecimento a minha querida e amada orientadora, Prof.^a Dr.^a Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro, que além de ter me aceitado com orientando, esteve lá sempre que precisei e com paciência e carisma, além de ser super prestativa e com ideias para cada momento sendo uma professora no mais alta grau dessa palavra. Também quero agradecer a minha família inteira a minha mãe

Francisquinha Costa, minha irmã Enilde Costa, meu irmão Anildo Costa e meus sobrinhos (Davi, Helena e Gabriela), além dos meus cunhados (Kleitton Gonçalves e Joelma Oliveira) e meus sogros (Damásio Erasmo e Francisca Costa). E por último, mas não menos importante quero agradecer a minha esposa Francisca Cardoso da Silva, que além de viver o mestrado no dia a dia, esteve comigo dentro da experimentação, me ajudando na dosagem dos ratos, além de ajudar com o peso dos órgãos e na correção dessa dissertação. Se eu tiver esquecido algum nome, peço diante mão desculpas, e para todos aqui: muito obrigado!

RESUMO

Foram feitos tratamentos experimentais para avaliar os efeitos da água de coco em pó (ACP®) sobre a espermatogênese de ratos. Utilizou-se 52 ratos wistar divididos em 07 grupos com 6 ratos cada, nos quais 03 grupos foram tratados com ACP® (125mg/100g peso corporal) 30 dias seguido de eutanásia (G1), 30 dias e eutanásia 60 dias - residual (G2), 60 dias seguido de eutanásia (G3). Além dos controles positivo tratados com 500mg/kg de PROMATER®, no tempo de 30 dias e 60 dias (G4 e G5) e controle negativo com Água destilada (1mL/100g), sendo eutanásia aos 30 dias e 60 dias (G6 e G7), respectivamente. Foram avaliados os seguintes parâmetros: o ganho de peso; a morfologia, motilidade e vigor espermático; a contagem e concentração espermática; a histopatologia dos órgãos sexuais e glândulas acessórias. A análise da fertilidade demonstrou impacto significativo aos valores padrão da CRBA (2013) de motilidade acima de 70%, vigor acima de 3 e morfologia acima de 80%, e na aplicação do ACP® 30 dias residual e teve os resultados: 91,68% para morfologia, 3,81 para vigor e 85% para motilidade e espermatozoides viáveis de 88,4%. Houve a biotransformação e absorção da substância pelo organismo, havendo um melhor desempenho no trato reprodutivo do indivíduo. Isto pode ser comprovado observando-se os resultados dos grupos ACP® 30 dias e ACP® 60 dias que tiveram resultados inferiores. A partir do presente estudo o trabalho foi eficaz, afirmando que o ACP®, após feito a avaliação, teve importância significativa na espermatogênese.

Palavras-chave: Fertilidade. Ratos. Nutracêuticos. ACP®.

ABSTRACT

Experimental treatments were carried out to evaluate the effects of powdered coconut water (ACP®) on spermatogenesis in rats. 52 wistar rats were divided into 07 groups with 6 rats each, in which 03 groups were treated with ACP® (125mg/100g body weight) 30 days followed by euthanasia (G1), 30 days and euthanasia 60 days - residual (G2), 60 days followed by euthanasia (G3). In addition to the positive controls treated with 500mg/kg of PROMATER®, at 30 days and 60 days (G4 and G5) and negative control with distilled water (1mL/100g), with euthanasia at 30 days and 60 days (G6 and G7), respectively. The following parameters were evaluated: weight gain; spermatic morphology, motility and vigor; sperm count and concentration; the histopathology of Organs sexual organs and accessory glands. Fertility analysis showed a significant impact on the CRBA standard values (2013) of motility above 70%, vigor above 3 and morphology above 80%, and on the application of ACP® 30 days residual and had the results: 91.68 % for morphology, 3.81 for vigor and 85% for motility and viable spermatozoa of 88.4%. There was biotransformation and absorption of the substance by the organism, with a better performance in the individual's reproductive tract. This can be proven by observing the results of the ACP® 30days and ACP® 60days groups, which had lower results. From the present study, the work was effective, stating that the ACP®, after the evaluation, had significant importance in spermatogenesis.

Keywords: Fertility. Rats. Nutraceuticals. ACP®.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Disposição anatômica do testículo direito e seminal e da próstata.....	20
Figura 2 - Esquema do processo espermatogênico na formação dos espermatozoides.....	21
Figura 3 - Esquema de diferenciação celular na espermatogênese do rato.....	26
Figura 4 - Esfregação úmido para avaliação da morfologia dos espermatozoides de ratos (100x).....	50
Figura 5 - Fotomicrografia da avaliação histopatológica dos órgãos reprodutivos..	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação semanal da massa corporal da média (g) dos ratos durante a realização do estudo, por grupo	42
Tabela 2 - Parâmetros espermáticos dos testículos direito e esquerdo de ratos Wistar por grupo.....	49
Tabela 3 - Massa dos órgãos sexuais e anexos (g) dos ratos.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

g	grama
bat./min.	batimento por minuto
mov./min.	movimento por minuto
°C	Graus Celsius
ml	mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
µm	micrometro
µl	microlitro
ACP®	Água de coco em pó
SHR	Ratos naturalmente hipertensos
TP	Proteínas de transição
ABP	Proteína fixadora de andrógeno
HAM	Hiperativação da motilidade
SOD	Superóxido dismutase
ROS	Reativas de oxigênio
AAS	Amostragem Aleatória Simples

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Ganho médio do peso dos animais submetidos ao experimento	41
Gráfico 2 - Ganho médio do peso dos animais dos grupos controles.	41
Gráfico 3 - Variação da massa corporal da média (g) dos ratos durante a realização do estudo, por grupo.....	43
Gráfico 4 - Motilidade dos espermatozoides proveniente dos testículos direito e esquerdo de ratos Ratus norvegicus por grupo.	46
Gráfico 5 - Vigor dos espermatozoides proveniente dos testículos direito e esquerdo de ratos Ratus norvegicus por grupo.	47
Gráfico 6 - Morfologia normal dos espermatozoides proveniente dos testículos direito e esquerdo de ratos Ratus norvegicus por grupo.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Delineamento experimental do estudo do efeito do ACP sobre a espermatogênese de ratos Wistar.	36
Quadro 2 - Médias por grupo das quantidades médias de espermatozoide, espermatozoides viáveis e concentrações espermáticas dos ratos.	51
Quadro 3 - Exame histopatológico das glândulas anexas (próstata e vesícula seminal) e testículos. *- maioria severa ** - maioria média *** - maioria mínima.	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Morfofisiologia do sistema reprodutor masculino de mamíferos	18
2.2	Espermatogênese em ratos.....	20
2.2.1	Fases e células da espermatogênese de ratos	23
2.3	Avaliação da motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática.....	26
2.4	Fertilização nos machos domésticos	28
2.5	Efeitos de substâncias químicas na espermatogênese.....	29
2.5.1	Efeitos do Nutracêutico na espermatogênese	30
2.6	Propriedades nutricionais e biotecnológicas da água de coco	31
2.7	Propriedades nutricionais do PROMATER®	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	Delineamento Experimental.....	35
4.2	Avaliação histopatológica	37
4.3	Avaliação viabilidade espermática	37
4.4	Análise Estatística.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Massa Corporal Absoluto e Relativo dos ratos	40
5.2	Avaliação dos Parâmetros Espermáticos	44
5.2.1	Motilidade espermática.....	44
5.2.2	Vigor espermática.....	46

5.2.3	Morfologia espermática	47
5.3	Contagem Espermática.....	50
5.4	Avaliação dos órgãos sexuais e anexos	51
5.4.1	Massa dos órgãos sexuais e anexos.....	51
5.4.2	Avaliação macroscópica	52
5.4.3	Avaliação Histopatológica.....	52
6	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	ANEXO.....	68
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	69
	ANEXO B – REVISTA CIENTIFICA.....	70

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é um dos temas mais estudado no ramo da ciência, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, vários testes laboratoriais já foram feitos para a melhoria na produção de gametas, tentando com isso resolver grandes problemáticas ligadas a reprodução, utilizando mecanismo para aprimorá-la. Sabendo que a infertilidade é definida como a incapacidade de engravidar após um período de relações sexuais regulares e sem uso de qualquer método contraceptivo, sendo um problema antigo e, ainda frequente na sociedade (SCHMIDT *et al.*, 2005).

Segundo Borges (2022), as causas da infertilidade em 30 % dos casos masculinos são as alterações no âmbito testicular, obstrução de dutos, patologias na próstata, alterações na ejaculação ou ereção e alterações no esperma. Em 30 % das causas femininas são a menopausa precoce, endometriose, obstruções ou lesões das tubas uterinas, anomalias uterinas e cervicais ou problemas ovulatórios. Em 20 % são relativas as causas mistas ou combinadas, nas quais os dois membros do casal são responsáveis e 20 % chega a ser uma causa inexplicável, dado que não foi possível identificar a causa.

Um dos fatores que podem estar ligados a fertilidade é citado por Robbins *et al.* (2012): “O estilo da dieta tem efeito direto nos espermatozoides”, compreendendo que uma modificação na dieta implicará em uma modificação na espermatogênese. Segundo Maia *et al.* (2020), utiliza-se os bioprodutos e os bioprocessos na reprodução animal têm-se obtenção das condições de fertilidade e de ganho genético mais acelerado, principalmente para espécies animais de interesse econômico. A aplicação de bioprodutos voltados para a melhoria reprodutiva podem ocorrer na suplementação alimentar através de nutracêuticos. Segundo Rodovanski *et al.* (2021) são substâncias químicas que servem para otimizar a complementação alimentar e que podem desempenhar melhorias em outras funções sistêmicas, como é o caso da espermatogênese que foi estudado nesse projeto. Um conceito de nutracêutico, Oliveira *et al.* (2002) afirma ser um suplemento alimentar que contém em sua fórmula compostos bioativos alimentares, que de forma concentrada tem como principal objetivo melhorar a saúde e além disso são produtos naturais formados por diversos componentes, que proporcionam benefícios para a saúde e o bem-estar dos animais. Desse o principal objetivo está em potencializar a

alimentação de maneira equilibrada e correta, com nutrientes essenciais como vitaminas, minerais, proteínas, antioxidantes, entre outros.

Um tipo de nutracêutico bastante utilizado em práticas biotecnológicas da medicina animal e humana é o ACP® (água de coco em pó) e segundo Aragão (2001), “a água de coco é uma fonte expressiva de vitaminas, com quantidades importantes de vitamina C nos frutos com 6 meses de maturação e vitaminas do complexo B, se constituindo em um produto com excelente qualidade nutricional, leve e com sabor único, além de baixos teores de carboidratos e lipídeos, contribuindo para um baixo valor calórico”.

Entende-se que as grandes inovações biotecnológicas na medicina veterinária tentam buscar por produtos naturais, principalmente de origem vegetal, que tem baixo risco de transmissão de doenças e a capacidade da maturação e incrementação da viabilidade dos gametas. Os pesquisadores procuraram nutracêuticos de fácil acesso e valores calóricos e nutricionais elevados na melhoria dos casos para a espermatogênese. Assim, a água de coco tem sido usada desde os anos 80 e 90, em muitos casos ligados a reprodução animal, como por exemplo a conservação de células espermáticas, com resultados significativos (NUNES,1998).

Dentro desta perspectiva, visando um melhor conhecimento dos efeitos do ACP® sobre a fertilidade de machos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da administração oral de nutracêutico a base de ACP® no processo espermatogênico em ratos wistar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

No estudo da fertilidade de machos deve ser dada ênfase especial à sua capacidade espermatogênica. Essa pode ser avaliada por diferentes métodos, incluindo, entre outros, análises quantitativas e qualitativa de sêmen obtido da cabeça do epidídimo; estimativas de reservas espermáticas gonádicas e extragonádicas, através de contagens hemocitométricas e epididimárias e estudos histológicos quantitativos do epitélio seminífero (BERNDTSON, 1977).

2.1 Morfofisiologia do sistema reprodutor masculino de mamíferos

O sistema reprodutivo dos mamíferos machos é constituído de diversos órgãos peculiares que atuam em conjunto para produzir espermatozoides e liberá-los no sistema reprodutor da fêmea. As principais partes funcionais do sistema genital masculino dos animais domésticos são o pênis, dois testículos, cada qual suspenso dentro da bolsa escrotal por um cordão espermático e pelo músculo cremaster externo. Os testículos têm duas funções: espermatogênese, a formação dos gametas masculinos e secreção do hormônio sexual masculino, testosterona. O escroto, junto com os músculos cremaster e a anatomia vascular das artérias e veias testiculares, tem como função a proteção e a regulação da temperatura, túbulos retos, túbulos eferentes, epidídimos, ductos deferentes, e glândulas acessórias incluindo a próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais. Este esforço conjunto envolve tanto o sistema neuroendócrino (hipotálamo e hipófise) quanto o genital. A reprodução é possível devido à produção de gametas ou células germinativas por esses órgãos (STANBENFELD e EDQVIST, 1996; VERONEZ, 2008).

As gônadas masculinas (testículos) dos ratos localizam-se suspensas na bolsa escrotal, externamente à cavidade abdominal e são responsáveis pela síntese de testosterona e função espermatogênica. Histologicamente e funcionalmente, o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos, compartimento intertubular e tubular (RUSSELL *et al.*, 1990; FRANÇA e GODINHO, 2003). O testículo é composto por túbulos seminíferos, onde são formados os espermatozoides e cada túbulo seminífero apresenta uma série de alças as quais

estão conectadas aos túbulos retos e estes conectam-se ao epidídimo. No compartimento intertubular encontram-se as células de Leydig, célula responsável pela produção de testosterona, vasos sanguíneos e linfáticos (RUSSELL et al., 1990).

Os túbulos seminíferos contêm um grande número de células germinativas (espermatogônias) localizadas em duas a três camadas ao longo da borda externa do epitélio tubular e essas células germinativas proliferam-se continuamente para manter seu número constante (KITA, 2004). Essas células germinativas, após sucessivas divisões, se diferenciarão gradativamente em espermatozoides durante o processo de espermatogênese (FRANÇA et al., 2005).

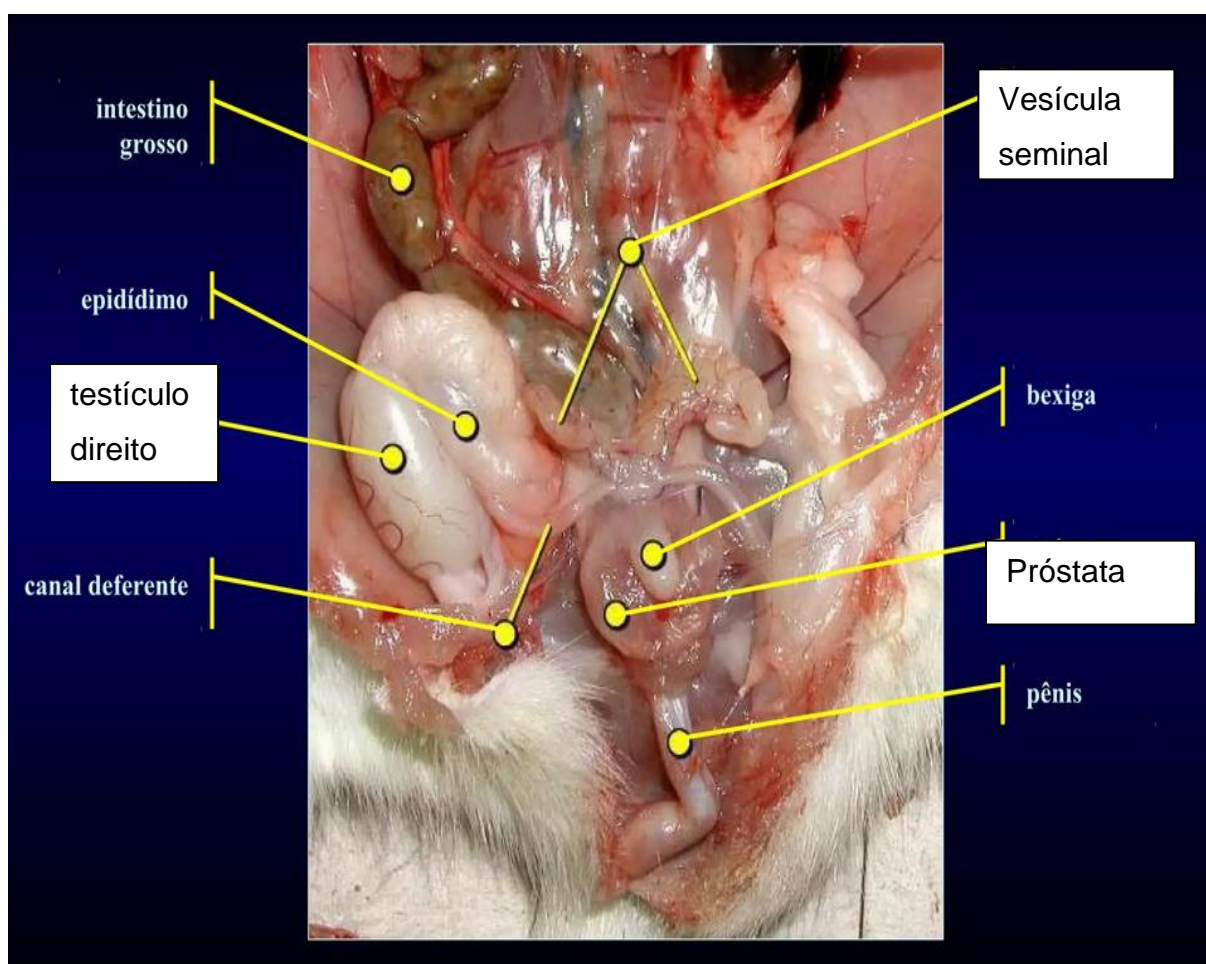
O epidídimo consiste em um único e longo ducto, altamente enovelado e contorcido, que conecta os ductos eferentes ao ducto deferente (SULLIVAN, 2004). Os espermatozoides saem dos testículos imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito. Eles só adquirem motilidade e capacidade fecundante após sua passagem pelo ducto epididimário (SHUM et al., 2009). Cada região do epidídimo apresenta funções distintas, sendo que o segmento inicial está relacionado com a absorção de fluidos vindos do testículo, as regiões da cabeça e corpo estão envolvidas com os processos iniciais e tardios de maturação espermática, como a aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de reconhecimento e fertilização do ovócito, enquanto que a região da cauda está associada com o armazenamento espermático e com a fagocitose de espermatozoides anormais (ROBAIRE e VIGER, 1995; CORNWALL, 2009). O tempo da passagem dos espermatozoides pelo ducto epididimário é espécie-específico, variando de 3 a 15 dias (COSENTINO e COCKETT, 1986). No rato, o tempo de trânsito é de 8 dias (ROBB et al., 1978; FRANÇA et al., 2005) e uma alteração nesse tempo pode alterar o processo de maturação espermática.

O rato possui todas as principais glândulas acessórias, tendo ainda umas glândulas entre a pele prepucial, as glândulas prepuciais, que drenam no saco prepucial (SANAR SAUDE, 2019). As glândulas acessórias que são órgãos túbulo-alveolares cuja secreção desemboca na uretra misturando-se com os espermatozoides no momento da ejaculação, para formar o sêmen e fornecer o fluido necessário para o transporte e a nutrição dos espermatozoides. Compreendem as vesículas seminais (glândulas vesiculares), a próstata, as glândulas bulbo-uretrais (glândulas de Cowper) e as glândulas uretrais (glândulas de Littre). A próstata é uma glândula ímpar túbulo-alveolar difusa presente em todos os

mamíferos foi assim chamada devido a sua localização anterior à bexiga e às vesículas seminais (SANAR SAUDE, 2019). Em ratos, a próstata é composta por lobos distintos que se arranjam ao redor da bexiga urinária: anterior, ventral, dorsal e lateral, sendo os dois últimos, frequentemente, agrupados como dorsolateral (Figura 1) (CUNHA et al., 1987; SHAPPELL et al., 2004).

As vesículas seminais são assim chamadas devido ao conceito inicial errado de que eram reservatórios de espermatozoides. Possuem tecido compacto arranjado em múltiplos lóbulos e com um sistema ramificado de dutos (SANAR SAUDE, 2019).

Figura 1 - Disposição anatômica do testículo direito e seminal e da próstata.

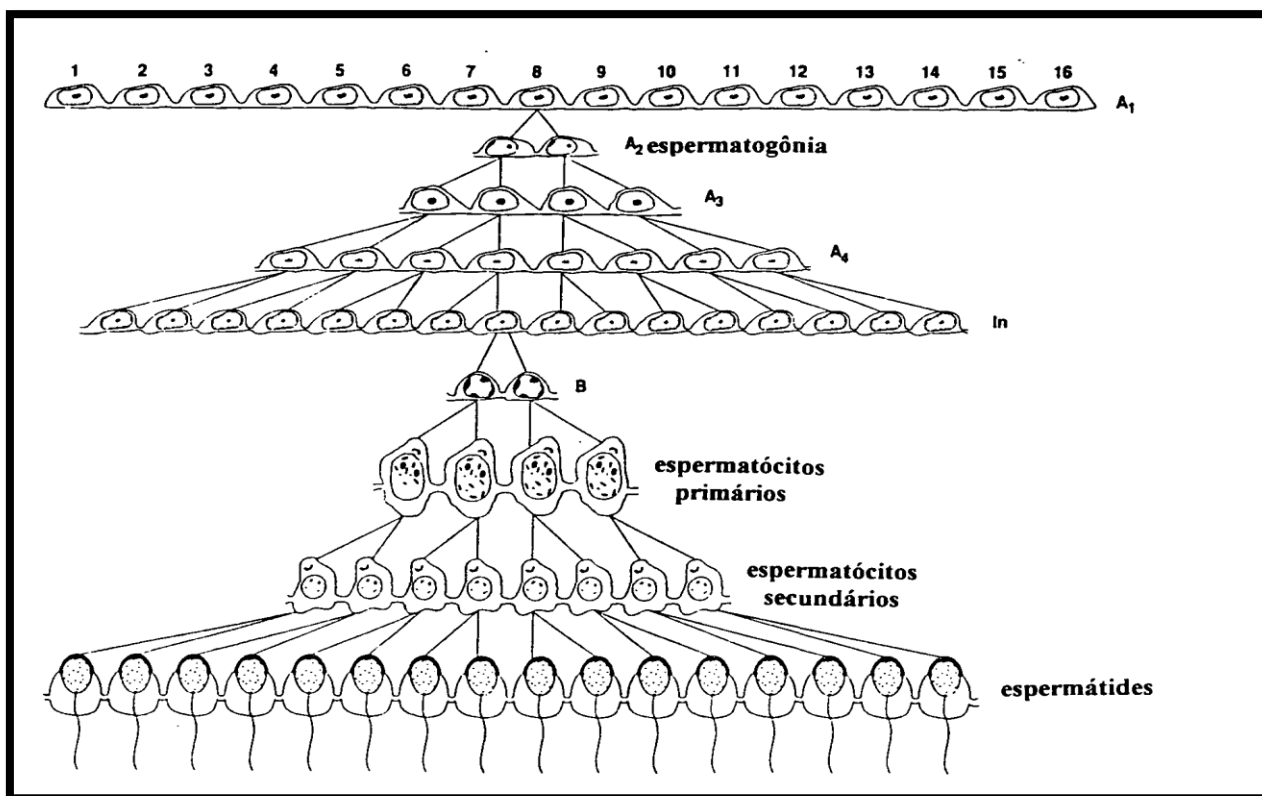


Fonte: ici.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/revlabo/rat/rat3.htm

2.2 Espermatogênese em ratos

A espermatogênese é um processo em que ocorrem diversas reações, a fim de produzir uma célula espermática diferenciada que é capaz de fertilizar o óvulo e contribuir para o crescimento do embrião de forma saudável, sendo necessário a regulação de mais de 2300 genes para que o processo ocorra em toda sua magnitude (CARRELL et al., 2016). Além de ser um processo complexo e sincronizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura cerca de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (FRANÇA et al., 2005). Durante este processo, uma espermatogônia (célula diploide) sofre uma série de divisões e se diferencia gradativamente em espermatozoide (célula haplóide) como mostra a figura 2. Os espermatozoides são estruturas alongadas, porém com um espaço interno muito pequeno para armazenar o material genético da mesma forma que ocorre nas células somáticas do organismo (SALES, 2016).

Figura 2 - Esquema do processo espermatogênico na formação dos espermatozoides



Fonte: Russel et al.1990.

A espécie *Rattus norvegicus*, variedades Wistar ou SHR (ratos naturalmente hipertensos), a maturidade sexual nos machos é de 70 dias (250 – 300g) e nas fêmeas:80 dias (150 – 200g) e o ciclo estral é de 4 a 5 dias, com período

de gestação de 20 a 22 dias e desmame aos 21 dias, sendo a vida reprodutiva do macho de um ano (UNIEVANGELICA, 2022).

A duração do ciclo espermatogênico varia de acordo com a espécie considerada. Em camundongos, a duração é de 34,5 dias, nos ratos é de 48 dias, no boi e carneiro, 49 dias e no homem, cerca de 64 dias (KITA,2004). A espermatogênese do rato Wistar está completamente estabelecida na sexta semana de vida, indicando a fase púbere do desenvolvimento sexual e em até 11 semana o rato Wistar atinge a produção espermática diária máxima e, portanto, a maturidade sexual (NUNES *et al*,2013).

Segundo Santos (2010), alguns parâmetros são importantes para o uso do rato wistar em pesquisa como o peso corporal adulto (g) variar entre 200 – 520, a temperatura corporal (°C) variar entre 35,9 – 37,5, frequência respiratória (mov./min.) variar entre 70 – 150, a frequência cardíaca (bat./min.) variar entre 250 – 600, o consumo alimentar variar entre 5 – 6g/100g de peso vivo/dia e a necessidade hídrica variar entre 10 – 12mL/100g peso corporal/dia.

Existem várias etapas de estudos dentro da espermatogênese nos ratos como por exemplo a duração do ciclo do epitélio seminífero que não é constante de uma espécie para outra e entre animais variedades diferentes dentro de uma mesma espécie (RUSSEL *et al.*, 1990) por exemplos, nos ratos Sherman o ciclo dura 12 dias (CLERMONT *et al.*, 1959); nos ratos Sprague-Dawley, 12,9 dias (CLERMONT e HARVEY, 1965); nos ratos Wistar 13 dias (HUCKINS, 1965) e nos ratos Bandicoot, 10 dias (SINHAHIKIM *et al.*, 1985). A duração da espermatogênese completa é considerada como o tempo necessário para formar espermatozoides a partir da espermatogônia e requer entre 4,0 e 4,5 ciclos do epitélio seminífero (RUSSEL *et al.*, 1990).

Durante a espermatogênese em ratos, ocorrem diversas mudanças como alongamento do núcleo e condensamento de cromatina, além da troca de histonas no DNA por outras proteínas. A troca de histonas ocorre gradualmente, sendo que as proteínas de transição (TP) antecedem as protaminas, que são as proteínas definitivas. Essas mudanças ocorrem para que os cromossomos fiquem bem compactados para caberem na pequena cabeça dos espermatozoides, formando uma sólida estrutura de cromatina, necessária para a maturação dos mesmos (SALES, 2016).

Os espermatozoides são o produto final da espermatogênese, processo que ocorre nas células de Sertoli, nos tubos seminíferos localizados nos testículos. A proliferação das células de Sertoli e das células germinativas ocorre em diferentes períodos do desenvolvimento testicular, com momentos distintos para cada tipo celular. O número de células de Sertoli estabelecido durante o período pré-púbere, determina o tamanho final do testículo e a produção espermática diária em animais sexualmente maduros (ORTH et al., 1988; FRANÇA et al., 2000). Na primeira etapa, as espermatogônias passam por uma série de divisões mitóticas, mantendo-se diploides e são denominadas de espermatócitos como mostra a figura 2. Na segunda etapa, os espermatócitos sofrem duas divisões meióticas, dando origem a quatro células haploides, denominadas de espermátides (SALES, 2016).

2.2.1 Fases e células da espermatogênese de ratos

No testículo de ratos existe uma distinção morfofuncional, dois recipientes básicos: (a) recipiente intersticial ou intertubular contendo células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e principalmente as células de Leydig, principal fonte de andrógenos do organismo; (b) recipiente tubular, formado pelos túbulos seminíferos no interior dos quais ocorre a espermatogênese (ALMEIDA, 1997).

O processo espermatogênico é dividido em três fases: a primeira é a fase proliferativa ou espermatogonial em que as espermatogônias proliferam e dão origem aos espermatócitos primários e, ao mesmo tempo, renovam a população espermatogonial necessária para a manutenção do processo; a segunda fase envolve divisões reducionais dos espermatócitos ou divisões meióticas, que resultam na formação de células haplóides, as espermátides; a terceira se caracteriza por uma complexa série de transformações citológicas das espermátides, que se convertem em células altamente especializadas, os espermatozoides (CLERMONT, 1972; RUSSEL et al., 1990) (Figura 2). A primeira e a terceira fase apresentam aspectos morfológicos que são espécie-específicos, enquanto a fase de espermatócitos ou fase meiótica possui características morfológicas comuns nas várias espécies de mamíferos (CLERMONT, 1972).

A fase espermatogonial é caracterizada pela autorenovação e diferenciação das espermatogônias, gerando células “amplificadoras” e de reserva ou células comprometidas com a diferenciação. Estas células mais diferenciadas dão

continuidade ao processo espermatogênico e um intrincado processo de diferenciação e proliferação ocorre até a última divisão mitótica que originará os espermatócitos primários (pré-leptótenos), dando assim início à fase espermatocitária (de Rooij & Russell, 2000).

As espermatogônias, que são as células germinativas imaturas, desenvolvem-se a partir das células germinativas primordiais por meio de divisão mitótica. As espermatogônias permanecem inativas até a puberdade, quando passam a se dividir continuamente por mitose, aumentando em número e fornecendo o suprimento para a linhagem celular subsequente (SCHNEIDER Et all,2022).

Na segunda fase as células germinativas que se originam por mitose da última geração de espermatogônias e passam pelo processo meiótico, isto é, por duas divisões sucessivas, levando à formação de células haploides, as espermatídes (ALMEIDA,1997). As espermatogônias cessa sua divisão, diferenciando-se em espermatócitos de primeira ordem ou primários. Cada espermatócito primário sofre uma divisão reducional (primeira divisão meiótica), resultando em duas células haploides, chamadas de espermatócitos secundários. É exatamente nelas que irá ocorrer a segunda divisão meiótica, originando-se quatro espermatídes haploides (SCHNEIDER *et al*, 2022).

No terceiro estágio da espermatogênese, as espermatídes sofrem diferenciação morfológica, dando origem aos espermatozoides maduros. Esse processo é denominado espermiogênese: as espermatídes perdem grande parte do citoplasma, tornando-se alongadas, e desenvolvem flagelos. Os espermatozoides serão, então, impulsionados ao epidídimo, onde sofrerão maturação subsequente. Todo o processo de espermatogênese dura cerca de 70 ± 4 dias (SCHNEIDER *et al*, 2022).

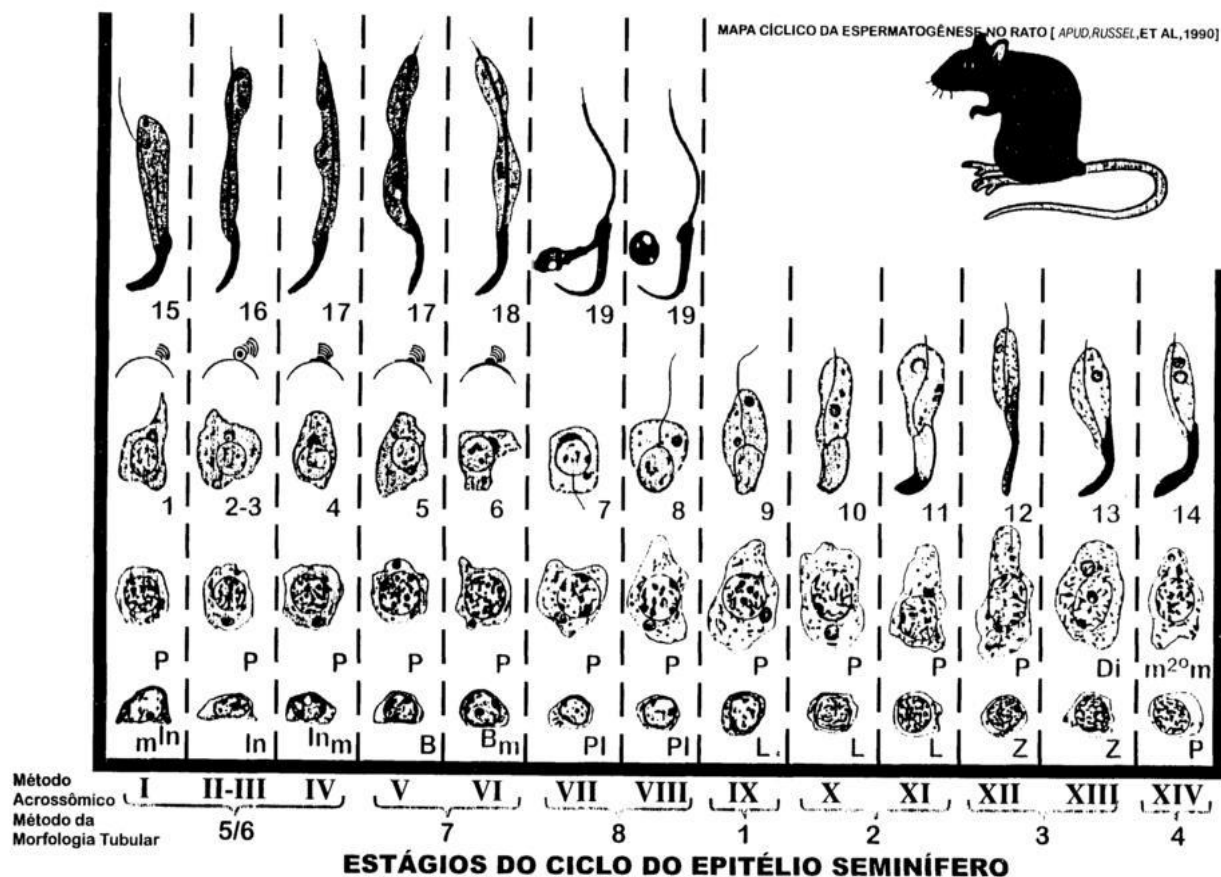
As principais alterações citológicas das espermatídes incluem uma extrema condensação da cromatina, o desenvolvimento de um flagelo para motilidade, a formação de um acrossomo para facilitar a penetração através dos envoltórios do ovócito, a migração de mitocôndrias para a peça intermediária e a eliminação do excesso de citoplasma sob a forma de corpos residuais (POCCIA, 1994). Elas se encontram na maioria dos túbulos seminíferos e são as mais numerosas. Como estas células estão em processo de citodiferenciação, a espermiogênese, para se transformar em espermatozoides poderão ser observadas

ainda, espermátides com formato ovalado, alongado ou fusiforme (SPADELLA et al, 2022).

As Células de Sertoli se localizam ao longo da borda externa dos túbulos, onde as espermatogônias ficam intimamente em contato com células de Sertoli que dão de suporte a elas. Essas células formam uma camada contínua na membrana basal do túbulo seminífero, estando firmemente aderidas umas às outras pelas tight-junctions (SCHNEIDER et al, 2022). Então as células de Sertoli são os elementos somáticos do epitélio seminífero. Admite-se que em mamíferos adultos elas não se dividem e mantêm invariável o seu número (ORTAVANT et al., 1984). Segundo HOCHEREAU-De REVIERS et al. (1987), os índices de células de Sertoli servem para avaliar a eficiência quantitativa do processo espermatogênico, devido a estabilidade da quantidade das células de Sertoli dois tipos principais de associações celulares do ciclo do epitélio seminífero podem ser distinguidos: Tipo I, com duas gerações de espermatócitos primários e uma geração única de espermátides; tipo II, com uma geração de espermatócitos primários e duas gerações de espermátides. Esses dois tipos, conforme se observa na Figura 3, correspondem, respectivamente, ao estágio pré-divisional (estágios 5 a 8, pelo método da morfologia tubular) e pós-divisional (estágios 1 a 3, pelo mesmo método).

O núcleo dessas células contém um grande nucléolo e profundas reentrâncias, e sua forma triangular ou alongada modifica-se durante o ciclo do epitélio seminífero (ORTAVANT et al, 1984). RUSSEL et al. (1990) (Figura 3), atribuíram várias funções às células de Sertoli: (a) manter a integridade do epitélio seminífero, através de sua união com outras células e elementos; (b) formar barreira hematotesticular, cuja base morfológica reside nas junções íntimas entre células de Sertoli adjacentes; (c) secretar fluidos para a formação do lume tubular; (d) participar na espermição, que é a liberação dos espermatozoides no lume tubular; (e) fagocitar células germinativas degeneradas durante a espermatogênese normal; (f) transferir nutrientes para as células germinativas; (g) envolver-se no metabolismo de esteroides; (h) translocar células dentro do epitélio seminífero, desde o compartimento basal, passando pelo intermediário, até o compartimento adluminal; (i) secretar proteínas, como a inibina e a proteína fixadora de andrógeno (ABP); (j) ser alvo para hormônios no testículo e mediar efeitos hormonais, pois possuem receptores para hormônio folículo-estimulante e para a testosterona (ALMEIDA, 1997).

Figura 3 - Esquema de diferenciação celular na espermatogênese do rato



Fonte: Russel et al.1990.

2.3 Avaliação da motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática

Dentro do estudo da espermatogênese destaca-se a questão da avaliação e função espermática que está diretamente ligada à motilidade, vigor e a concentração; e a morfologia espermáticas que são características da avaliação classicamente nas amostras de sêmen (ARRUDA, et al., 2011).

A motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. No entanto, é a técnica mais utilizada na rotina laboratorial e continua tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade (ARRUDA, et al, 2011). A avaliação automatizada da

motilidade dos espermatozoides é importante devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (VERSTEGEN et al., 2002).

A motilidade (porcentagem de espermatozoides móveis), apresenta correlação com a fertilidade e deve ser avaliada imediatamente após a coleta do esperma. O espermatozoide deixa o testículo antes de adquirir total motilidade e sem a capacidade de reconhecer e fertilizar o ovócito. Para se tornar um gameta funcional, ele deve migrar através de um longo ducto, o epidídimo, e passar por um processo adicional de maturação (SCHNEIDER et al,2022). O sêmen não deve sofrer choques térmicos e ação dos ventos, que podem comprometer a sua qualidade. Em condições de campo, a motilidade muitas vezes é prejudicada, sem comprometer, porém, o exame final. O ideal é manter o sêmen, desde a coleta até as avaliações, numa temperatura semelhante a corporal (37,5°C) (MIES FILHO, 1975). O conhecimento da porcentagem de espermatozoides vivos e mortos no ejaculado serve para assegurar a avaliação da motilidade (células vivas) e para se estimar a taxa de diluição no caso da conservação do sêmen (SCHNEIDER et al,2022).

A motilidade progressiva individual ou vigor do espermatozoide é dada em uma escala de 0 a 5, que representa a intensidade de deslocamento da célula no campo do microscópio. O número representa a totalidade dos espermatozoides em movimento progressivo retilíneo, com a nota de 5 a 1, com todas as células imóveis, e 0 (zero) com ausência de espermatozoides (MIES FILHO, 1975). Para avaliação do vigor da motilidade, usa-se a seguinte classificação: a) Grau 5: 90 a 100% dos espermatozoides móveis apresentam movimentação progressiva; b) Grau 4: 60 a 90% dos espermatozoides móveis apresentam movimentação progressiva; c) Grau 3: mais que 50% com movimentação progressiva; d) Grau 2: menos de 50% com movimentação progressiva; e) Grau 1: só se observa movimentos irregulares (SORENSEN,1979).

A morfologia do espermatozoide consiste em saber que: a) Cabeça - geralmente é alongada e aplanada. Nela estão o núcleo da célula e uma organela denominada acrossomo - é uma estrutura membranosa rica em enzimas as quais têm importância para a penetração no óvulo; B) Colo - é uma região de constrição onde estão os centríolos; C) Peça intermediária - é a região seguinte, onde estão as mitocôndrias, organizadas em forma de espiral em torno do filamento central; D)

Flagelo - é constituído de uma sucessão de microfibrilas circulares (FAMEMA, 2022). Podendo através do estudo morfológico identificar algumas alterações como: Cauda isolada normal, cauda dobrada, enrolada, fortemente dobrada, gota citoplasmática distal e citoplasmática proximal, cabeça gigante e pequena anormal, podendo assim alterar o seu funcionamento normal.

As percentagens de vivos e mortos são determinadas antes da coloração de uma amostra do sêmen. As colorações mais comumente utilizadas são de eosina-nigrosina, e fastgreen (SCHNEIDER *et al.*, 2022). O corante utilizado difunde-se na célula morta enquanto a viva permanece incolor. A lâmina é examinada sob imersão, onde são contadas, no mínimo, 200 células (EMBRAPA, 2022). A concentração é dada pela quantidade de células no volume do ejaculado obtido e pode variar com o método de coleta (menor na eletroejaculação), com a nutrição, estações do ano, raça, indivíduo, estado psíquico, além de problemas patológicos (GARCIA 1971, GALLOWAY 1974, DEDE *et al.* 1983, SILVA *et al.* 1987).

2.4 Fertilização nos machos domésticos

A fertilização é o processo pelo qual o gameta masculino e o feminino se unem, formando um indivíduo geneticamente distinto. Após o intercuro sexual os espermatozoides móveis seguem pelas tubas uterinas no trato reprodutivo feminino, em direção ao óvulo. O meio ácido favorece o processo de hiperativação, no qual o espermatozoide se torna mais rápido para penetrar a camada externa do óvulo. A camada interna do óvulo, denominada zona pelúcida, só é penetrada na segunda etapa da capacitação, quando ocorre a reação do acrossoma e conseqüente liberação de enzimas digestivas que rompem a membrana da zona pelúcida, possibilitando a entrada do material genético do gameta masculino. Durante este processo, simultaneamente, o óvulo libera enzimas que reorganizam as glicoproteínas da zona pelúcida, tornando-a impenetrável, evitando assim a fertilização por múltiplos espermatozoides (KRAUCHUNAS; *et al.* 2016).

Para conseguir fertilizar o óvulo, o espermatozoide após entrar no trato reprodutivo feminino, deve antes passar por uma série de reações bioquímicas e fisiológicas, chamadas coletivamente de capacitação, um processo que envolve a polimerização da actina e a hiperativação da motilidade (HAM) (BUFFONE *et al.*,

2014). Os gametas masculinos e femininos em animais domésticos são muito susceptíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo, sofrendo alteração dos ácidos graxos poli saturados das suas membranas (peroxidação lipídica), e em consequência disso alterações das suas funções (SILVA *et al.*, 2011).

2.5 Efeitos de substâncias químicas na espermatogênese

Muitas substâncias químicas produzidas artificialmente pelo homem de forma intencional ou não são lançadas ao meio ambiente. Algumas destas substâncias possuem o potencial de interferirem no sistema endócrino de forma transitória ou permanente, atuando de forma positiva ou negativa no sistema reprodutor masculino (QUEIROZ, 2005).

Segundo RUSSEL *et al.* (1990), a avaliação histológica do epitélio seminífero é um componente essencial para determinar eventuais efeitos tóxicos de uma droga na fertilidade de machos. O estilo da dieta tem efeito, então direto nos espermatozoides, pois um estudo de caso-controle testou se a simples adição de 75 g/dia de nozes, na dieta estilo ocidental de jovens do sexo masculino, entre 21 à 35 anos de idade para melhoraria dos parâmetros do espermatograma. Após 12 semanas, níveis séricos de ômega 3 e 6 aumentaram no grupo que consumiu as nozes, assim como os parâmetros de vitalidade e motilidade dos espermatozoides, melhorando até a morfologia dos mesmos (ROBBINS *et al.*, 2012).

Em um estudo dosando os níveis de zinco (Zn) e ferro (Fe) no fluido seminal de humanos, assim como a atividade da superóxido dismutase (SOD), notou-se uma maior quantidade de Ferro em fluidos seminais de homens que apresentavam teratozoospermia, do que em homens com espermatozoides de morfologia adequada, sugerindo que o Fe possa influenciar na morfologia dos espermatozoides. A atividade da SOD se mostrou relacionada a motilidade e concentração de espermatozoides e volume de sêmen, podendo melhorar o diagnóstico de infertilidade masculina (WROBLEWSKA *et al.*, 2011). Uma dieta pobre em Zinco, pode ser um fator de risco importante para baixa qualidade de espermatozoides na infertilidade masculina idiopática (COLAGAR; MARZONY; CHAICHI, 2009).

Então, sabe-se que a dieta alimentar é um dos fatores que influenciam na produção de espermatozoides (MENDELUK et al., 2015; GRISWOLD, 2016), portanto uma alimentação inadequada, deficiências nutricionais e baixa ingestão de antioxidantes causam desequilíbrios na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MENDELUK et al., 2015) ocasionando no resultado do espermatograma e aparecimento de anormalidade na amostra seminal.

Estudo já feitos mostram que a vitamina E melhora a motilidade, porém, quando associada ao selênio melhora não só a motilidade, como também, a viabilidade e morfologia dos espermatozoides de indivíduos oligoastenoterazospérmicos. Já a associação da vitamina E com betacaroteno aumenta a concentração do esperma de indivíduos inférteis (VIEIRA et al., 2012).

2.5.1 Efeitos do Nutraceutico na espermatogênese

O nutraceutico que tem como conceito qualquer substância que pode ser considerada um alimento, ou parte de um alimento e fornece benefícios médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças (DE FELICE, 2005). Os nutraceuticos podem ir desde nutrientes isolados, suplementos dietéticos, alimentos produzidos por engenharia genética, produtos à base de plantas e produtos processados, como cereais, sopas e bebidas (RISHI, 2006). É indiscutível que muitas destas substâncias têm funções fisiológicas e atividades biológicas essenciais ao bom funcionamento dos organismos (ANDLAUER et al, 2002).

A indústria tem disponibilizado no mercado uma série de substâncias (nutraceuticos) com a intenção de otimizar a utilização de nutrientes em algumas vias metabólicas, influenciando positivamente o desempenho reprodutivo dos animais. No entanto, a resposta ao uso de nutraceuticos varia de acordo com o animal. Como o organismo é altamente complexo e, a fim de alcançar perfeita atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, uma interação ideal na base molecular é necessária, onde os nutraceuticos podem ter sua ação direta (ARRUDA, 2010).

O consumo de alimentos como frutas e vegetais, ricos em nutrientes e componentes bioativos, tem se mostrado mais eficiente na promoção da saúde e

bem estar do que suplementos alimentares. Isso devido aos efeitos sinérgicos que ocorrem entre os diversos componentes presentes nos alimentos, o que não ocorre nos suplementos, onde os compostos são geralmente isolados (LIU, 2013). No entanto, alguns suplementos nutricionais obtiveram resultados positivos na fertilidade masculina quando testados em estudos controle randomizados, os quais incluem a coenzima Q10, glutatona, selênio, zinco e folato combinados, ômega-3, escina (YAO; MILLS, 2016).

Foi testado o efeito da suplementação de óleo da semente de *Nigella sativa L.* sobre a qualidade do fluido seminal de homens em um estudo randomizado duplo-cego controle com placebo, realizado com iranianos inférteis com baixa motilidade e contagem de espermatozoides. Após dois meses de suplementação com uma dose de 2,5mL duas vezes ao dia, o grupo tratado demonstrou melhora na contagem, motilidade e morfologia, além de aumento do volume do sêmen e melhora no pH, comparado com o grupo controle (KOLAHDOOZ *et al.*, 2014). O antioxidante Menevit, que contém licopeno, vitamina E, vitamina C, zinco, selênio, folato e alho, foi administrado por 3 meses antes do ciclo de fertilização *in vitro* das suas parceiras, melhorando a taxa de gravidez comparado com placebo (TREMELLEN *et al.*, 2007).

No sistema reprodutivo do macho, a vitamina D foi demonstrada ser responsável por diversas ações mediadas pelo receptor de vitamina D (VDR), incluindo a regulação da transcrição de vários genes envolvidos na atividade mitótica do núcleo das espermatogônias, afetando o metabolismo dos espermatozoides, controlando a síntese de estrogênio pelas gônadas, além de aumentar o cálcio intracelular e ativar diversas vias de sinalização. Portanto, a insuficiência de vitamina D, em homens que apresentam oligoespermia e astenoespermia, pode ser um fator a ser levado em consideração, sendo a suplementação recomendada nesses casos (SALES, A.K.,2016).

2.6 Propriedades nutricionais e biotecnológicas da água de coco

O gênero *Cocus* é constituído apenas pela espécie *Cocus nucifera L.* que, por sua vez, é composta por algumas variedades, entre as quais, as mais importantes, do ponto de vista agrônômico, socioeconômico e agroindustrial são: *Typica* (var. gigante) e *Nana* (var. anã), onde o *Nana* constitui-se na variedade de

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

O coqueiro (*Cocos nucifera L.*) é uma das plantas arbóreas mais úteis do mundo (ARAGÃO, 2001). A planta, oferece as mais diversas possibilidades de utilização, todas as suas partes, como raiz, caule, folha, inflorescência e fruto são empregados para fins artesanais, alimentícios, nutricionais, agroindustriais, medicinais e biotecnológicos, entre outros. Uma das suas principais utilidades atuais no Brasil, com grande perspectiva de uso internacional é o aproveitamento da água de coco (CARVALHO, 2006).

A água de coco é uma fonte expressiva de vitaminas, que contém quantidades importantes de vitamina C, nos frutos com 6 meses de maturação e vitaminas do complexo B, se constituindo em um produto com excelente qualidade nutricional, leve e com sabor único, além de baixos teores de carboidratos e lipídeos, o que contribuem para um baixo valor calórico. A água-de-coco corresponde a aproximadamente 25% do peso do fruto, e sua composição básica apresenta 93% de água, 5% de açúcares, além de proteínas, vitaminas e sais minerais, sendo uma bebida leve, refrescante e pouco calórica, apresentando em média 20 calorias/100 ml (ARAGÃO, 2001).

Por ser uma solução estéril, ligeiramente ácida, composta de proteínas, sais, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhe conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, a água de coco fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e a viabilidade dos gametas masculinos e femininos crio preservados. Foi isolada da água-de-coco uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol-acético (JVP), o qual confere aos espermatozoides um incremento na motilidade e porcentagem de espermatozoides vivos, aumentando a taxa de fertilidade (CARVALHO, 2006).

A água de coco é um produto natural de grande potencial biológico, e sua utilização abrange diversas áreas, apresentando resultados que demonstram sua eficiência na reprodução como também, apresenta uma relação custo-benefício favorável quando comparada aos demais diluentes disponíveis no mercado (BARROS e TONIOLLI, 2011).

No entanto, água de coco *in natura* sofre mudanças na sua composição durante o desenvolvimento do fruto além de ser uma substância extremamente perecível (CASTAÑEDA, 2018). Fatores diretamente relacionados às condições às quais os frutos ficam expostos durante a colheita, pós-colheita e comercialização como grau de maturação, variedade, região e época do ano de produção têm influência sobre as suas características físico-químicas (RESENDE et al., 2008).

Diante disto, foi então desenvolvido um diluidor comercial, a água de coco em pó (ACP®), sendo este, um pó resultante do processo de desidratação da água de coco e ajustado quanto ao pH e osmolaridade para cada espécie a ser utilizado. Segundo as recomendações do fabricante, o pó é reconstituído em água destilada e adicionado de protetores de resfriamento e/ou congelação de acordo com a finalidade, podendo ou não ser adicionado antibiótico (SALGUEIRO et al., 2002; CASTAÑEDA, 2018).

2.7 Propriedades nutricionais do PROMATER®

O PROMATER® PET auxilia na reprodução e é um suplemento contendo vitaminas, minerais, aminoácidos, beta-caroteno, l-carnitina e ômega 3, 6 e 9. Sua fórmula reúne os nutrientes responsáveis pela obtenção dos melhores resultados no desempenho reprodutivo de machos e fêmeas. tem como **principais vantagens ser** produto voltado exclusivamente para reprodução e participa ativamente na otimização da atividade funcional dos tecidos voltados à reprodução (VETNIL,2022).

É indicado para cães, gatos e pequenas aves em fase de reprodução, ma. indicado também para fêmeas na fase de gestação ou postura. Possui elementos fundamentais para a reprodução, entre eles, beta caroteno, l-carnitina e ácidos graxos, como ômega 3 (ácido linolênico), ômega 6 (ácido linoleico) e ômega 9 (ácido oleico). É utilizado em animais que se encontram no período de reprodução e animais em gestação. Tem-se modo de usar em pequenas aves: 5 g por kg de ração ou farinhada; cães e gatos: 0,5 g do produto por kg de peso corporal do animal, duas vezes ao dia, até a dose máxima diária de 40 g, ou 20 a 40 g por kg de alimento ou ração e em ratos 500mg/kg de acordo com o fabricante (VETNIL,2022).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da administração oral de nutracêutico a base de ACP® no processo espermatogênico em ratos wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do nutracêutico a base de ACP® sobre órgãos reprodutivos em ratos wistar
- Verificar se há interferência do nutracêutico ACP® sobre a viabilidade espermática dos ratos wistar;
- Estudar o efeito do nutracêutico a base de ACP® sobre as glândulas anexas (próstata e vesícula seminal) em ratos wistar;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal no CCA (Centro de ciências agraria) e Biotério Setorial II, localizado no Departamento de Biofísica e Fisiologia do Centro de Ciências da Saúde Central da Universidade Federal do Piauí - UFPI, *campus* Petrônio Portela, Teresina - Piauí, Brasil. Os protocolos foram executados no período de 2021 a 2022, sendo que a metodologia desenvolvida neste experimento foi submetida ao Comitê de Ética e Experimentação Animal, registrada com nº 663/2020.

4.1 Delineamento Experimental

O delineamento estatístico e experimental se baseia no “*Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas – 421 Teste de triagem de reprodução /desenvolvimento de toxicidade*” publicado no livro Métodos Alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil (MORETTO, L.D.; STEPHANO, M.A., 2019), adaptado para os testes de avaliação sobre a reprodução dos machos sem incluir a reprodução em fêmeas.

O cálculo amostral determinou que o número mínimo de animais por grupo experimental para uma análise estatística válida é dado conforme utilizado no modelo de Cochran (1965), denominado Amostragem Aleatória Simples (AAS) para população infinita.

Foram utilizados 52 ratos (*Ratus norvegicus*, variedade Wistar), machos, fornecidos pelo Biotério Central (BIOCENTRAL) localizado no centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí. Estes foram mantidos durante o experimento no Biotério Setorial de Experimentação II em gaiolas-padrão, com temperatura controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) com um ciclo de 12h claro/escuro, tendo livre acesso à água e ração, porém antes do tratamento os animais ficaram jejum sólido por 6 horas. Todos os animais antes do início dos estudos passaram por um período de adaptação de acordo com a necessidade de cada protocolo e com as normas de bem-estar (NR 30 de 03/20/2016-CONCEA).

O tratamento foi realizado utilizando o Nutracêutico a base de água de coco em pó (ACP®) de acordo com a recomendação do fabricante (ACP® biotecnologia-Fortaleza-Ceará- Brasil) de 125mg/100g de peso vivo. Os grupos consistiram em três grupos testes tratados com ACP®; dois controles positivos com PROMATER®

com dose de 500mg/kg com recomendação do fabricante e dois controles negativos (água destilada) de 1mL/100g , padrão nas pesquisas, estes foram tratados durante 30 ou 60 dias e depois eutanasiados após a administração das substâncias testes e controles (Quadro1). Os animais também foram pesados semanalmente para posterior análise da evolução do ganho de peso durante os tratamentos.

Quadro 1 - Delineamento experimental do estudo do efeito do ACP sobre a espermatogênese de ratos Wistar. Nota: N= número de animais; VO=via oral. G1: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G2: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G3: Nutracêutico ACP trat. p/ 60 dias, G4: Promater® tratados p/ 30 dias, G5: Promater® tratados p/ 60 dias, G6: Água destilada trat. p/ 30 dias, G7: Água destilada trat. p/ 60 dias

N	Grupos	Eutanásia (dias)	Dose	Vias de administração
06	G1: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias	30	125mg/100g	V.O.
06	G2: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias	60	125mg/100g	V.O.
06	G3: Nutracêutico ACP trat. p/ 60 dias	60	125mg/100g	V.O.
06	G4: Promater® tratados p/ 30 dias	30	500mg/1kg	V.O.
06	G5: Promater® tratados p/ 60 dias	60	500mg/1kg	V.O.
06	G6: Água destilada trat. p/ 30 dias	30	1mL/100g	V.O.
06	G7: Água destilada trat. p/ 60 dias	60	1mL/100g	V.O.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os animais foram eutanasiados de acordo com a nova Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA através da RN nº 37, de 15/02/18 (CONCEA, 2018) com sobredose de Xilazina 2% (20mg/Kg) e Cetamina (140 mg/kg) por via intraperitoneal (IP), sob supervisão da médica veterinária do programa, Profa. Dra. Maria Zenaide de L. C. Moreno Fernandes (CRMV-PI 0623).

Em seguida, por meio de laparotomia foi feita a remoção e pesagem das glândulas sexuais acessórias: próstata e vesículas seminais, bem como outros órgãos de metabolização fígado, pulmão e rins. Os órgãos coletados foram pesados e fixados em formol tamponado a 10% para posterior avaliação histopatológica.

4.2 Avaliação histopatológica

Na coleta dos testículos fez-se uma incisão mediana foi feita ao longo do eixo longitudinal do escroto, através da qual os testículos retirados e separados do epidídimo que foi colocado em solução fisiológica para avaliação espermática a fresco. Posteriormente foram pesados, identificados e armazenados individualmente em formol tamponado a 10% (aldeído fórmico). Após laparotomia da cavidade abdominal foram retiradas as glândulas sexuais acessórias: próstata e vesículas seminais, além dos órgãos de metabolização fígado, pulmão e rins. Todos os órgãos foram pesados em balança analítica (0,001g) e o resultado foi expresso em termos de massa absoluta e massa relativa ao peso corporal (GRAÇA et al., 2007).

Numa fase posterior todos os órgãos coletados foram submetidos ao processamento histopatológico: desidratação em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3 µm e submetidos a coloração com hematoxilina-eosina e examinados microscopicamente para a verificação de possíveis alterações histopatológicas (BEÇAK; PAULETTE, 1976; TOLOSA et al., 2003).

4.3 Avaliação viabilidade espermática

No estudo do efeito do ACP[®] sobre a fertilidade os espermatozoides após a retirada do epidídimo observados a motilidade, morfologia e vigor dos espermatozoides. Estes foram coletados da cabeça do epidídimo que foi fatiado com lâmina de bisturi e homogeneizados em 2 ml de ACP[®] em placa de Petri aquecida a 37,5°C, e por fim cada epidídimo (D e E) separadamente foi transferido com todo o volume para um tubo do tipo Eppendorf.

Na avaliação da motilidade fez-se um esfregaço logo após a retirada da cauda do epidídimo. Neste foi observado os espermatozoides que estavam se movimentando na lâmina e o resultado dado em porcentagem.

Quanto ao vigor que levou em consideração a direção ordenada que os espermatozoides se movimentam na gota da lâmina, com valores variando de 1 a 5, sendo 1 o pior vigor e 5 o melhor.

Posteriormente as análises a fresco do tubo tipo Eppendorf, onde a cabeça do epidídimo foi armazenada em nitrogênio líquido, foi retirado volume de 5 µl de sêmer e diluído em 1.995 µl de água destilada para contagem do número total de espermatozoides em câmara hemocitométrica (câmara de Neubauer), na qual foram contados cinco campos de 16 pequenos quadrados multiplicado pelo fator de correção (3 X 0,520833) (ROBB *et al.*, 1978). Para analisar e processar as imagens foram utilizados o Threshold, modo Binnary, Analyze Particles e outros com a especificidade da contagem e mensuração O número de espermatozoides foi determinado por meio da seguinte fórmula:

$$N = C \times FC \times D$$

Onde: N – número total de espermatozoides por animal

C – número médio de espermatozoides contados

FC – fator de correção

D – fator de diluição 10⁶

A contagem das células espermáticas proporcionou uma avaliação do decorrer da espermatogênese, assim como também proporciona uma avaliação da funcionalidade das células do epitélio testicular e funcionalidade da cauda do epidídimo como órgão responsável pela armazenagem espermática. A contagem de células espermáticas foi de 200 espermatozoides por testículos de rato estudado no trânsito espermático dos grupos tratados. Para cada um dos ratos, dentro de cada grupo, foi feita uma média dos valores de quantidade de espermatozoides, espermatozoides viáveis e concentração espermática dos dois testículos.

A câmara de contagem, também conhecida como câmara de Neubauer, Fuchs Rosenthal ou ainda hemocitômetro foi usada para a determinação do número de células em um volume específico de solução, nesse caso serviu de forma mais abrangente. Depois de diluída, a amostra foi cuidadosamente introduzida no espaço entre a lâmina e a câmara de Neubauer, preenchendo-a completamente por capilaridade. A câmara de contagem foi levada ao microscópio, permitindo a visualização da malha e dos quadrantes. As marcações dos quadrantes tiveram dimensões distintas, permitindo que sejam realizadas contagens de células de tamanhos diferentes, grandes ou pequenas (KASVI, 2020).

A morfologia espermática que leva-se em consideração a forma que foram encontrados no esfregaço, tem-se a porcentagem daqueles que se encontram sem defeitos ou alterações, os demais percentuais se encontram aquelas com alguma anormalidade (cauda: isolada normal, dobrada, enrolada, fortemente dobrada; gota citoplasmática distal e citoplasmática proximal; cabeça gigante e pequena anormal). Para avaliação dos defeitos nos espermatozoides foi trabalhado com um total de 200 espermatozoides por testículo de animal foi avaliado em um microscópio, com aumento de 100 vezes.

4.4 Análise Estatística

Realizou-se então os testes de Normalidade de Shapiro-Wilk e Homocedasticidade de Levene, dos sete grupos para de cada uma das três variáveis. De acordo com o teste de Shapiro Wilk, o grupo ACP® 30 dias não apresentou normalidade dos dados para os dados de espermatozoides viáveis e concentração espermática. Dessa forma, para essas duas variáveis, o estudo de diferença das médias por pares ficou limitado aos demais grupos.

Para a análise estatística dos dados, foram feitos cálculos da média aritmética e do desvio padrão para os parâmetros: Número de células espermatogênicas, com o software R-Project e Microsoft Excel, versão 2016. Para comparação dos grupos Experimentais e Controles foram utilizados o teste "T-Student" e Comparativo de Médias para detectar diferenças entre os tratamentos.

Os dados do peso, morfologia, motilidade, vigor e concentração espermáticas foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico, Graphpad Prism® versão 5.0, através da análise de variância ANOVA One-way.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos grupos que usaram o ACP® com os grupos do PROMATER® e água destilada foram comparados entre si. Os dados avaliados após o período experimental para os parâmetros de foram motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática além da análise histopatológica, peso e morfologia dos órgãos reprodutivos.

5.1 Massa Corporal Absoluto e Relativo dos ratos

A importância da avaliação da massa corpórea do rato é para que o teste mostre se houve interferência das substâncias administrada, indicando assim que a substância acaba sendo um fator no ganho de massa, também pode se tirar a conclusão que se o rato estiver com a massa corporal abaixo da média indicaria que a substância está modificando o estudo. Todos os grupos testados tiveram um ganho de massa dentro do padrão e segundo Neves *et al.*, (2013) os ratos Wistar Macho apresentam Peso médio do adulto entre 8 à 10 semanas entre 240 à 400g e também segundo Wurtman e Miller (1976), que diz que ao avaliar ratos não encontraram grandes diferenças na massa adiposa ou no peso corporal em animais de 21 aos 58 dias de vida e sua massa estava dentro dos parâmetros normais do crescimento de um rato normal da raça Wistar, então esse parâmetro se tivesse alguma alteração acentuada poderia indicar a inviabilidade do organismo para o experimento.

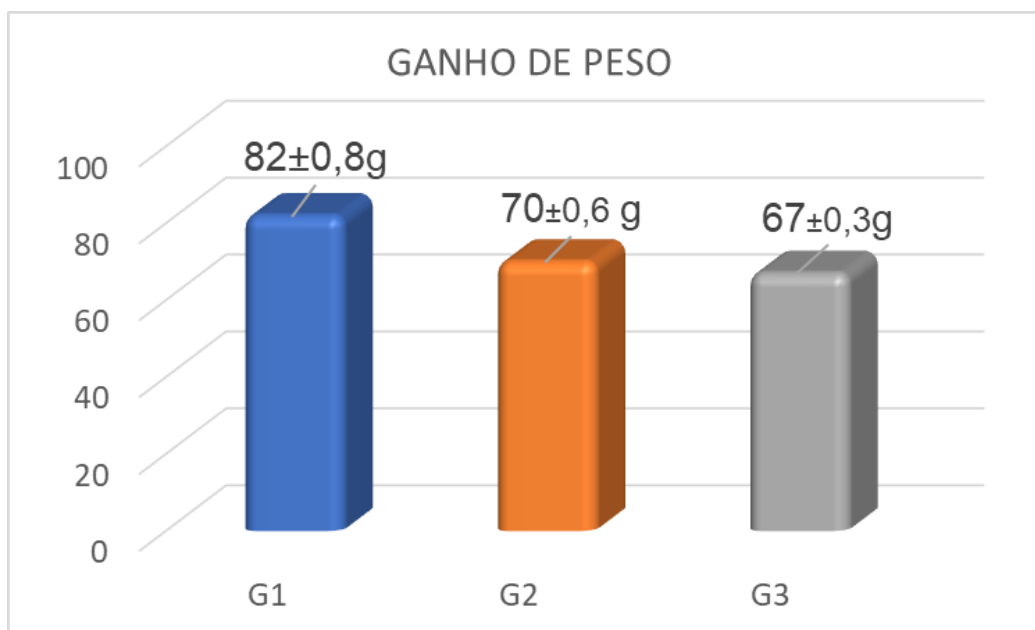
Os grupos estudados do ACP® em relação de ganho de massa corporal durante o período do tratamento, não houve diferença significativa em relação ao padrão normal já estudado como mostra a gráfico 1 e o gráfico 2. Quando se observou o peso de cada animal por grupo de acordo com seu aumento corporal durante o experimento, a variação do peso não houve diferença significativa ($P > 0,02$) entre os grupos.

Os resultados demonstrados no gráfico 1 levaram em consideração o dia 1 do experimento e dia 30 ou dia 60, o dia da eutanásia como mostra o quadro 1, os ratos iniciaram e encerram os tratamentos com as substâncias dentro do peso normal, como mostra a tabela 1. São apresentados os valores médios corrigidos do peso geral dos ratos desde o início do tratamento até a eutanásia dos animais, os grupos

G1, G2 e G3 tiveram um ganho de peso médio absoluto e relativo que foi de aproximadamente 82g (24%), 70g (16,5%) e 67g (18,2%), respectivamente. Assim, pode se observar com esses dados que o ACP não interferiu no ganho da massa corpórea, embora esse ganho tenha sido menor quando comparado com os grupos controles positivos (G4= 79g/23% e G5 = 102g/28%) e negativos (G6 = 74g/25% e G7 = 90g/27%) como mostra o gráfico 2.

Gráfico 1 - Ganho médio do peso dos animais submetidos ao experimento.

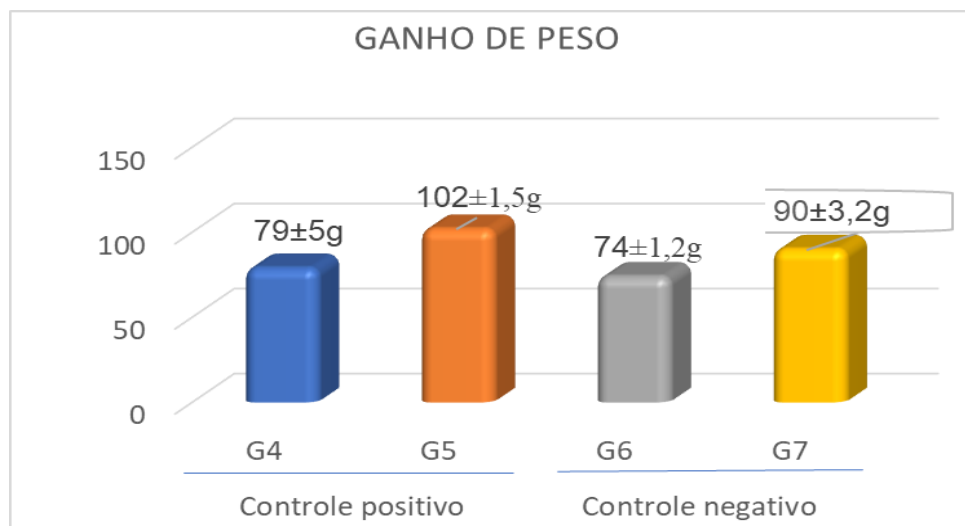
Os dados expressam média \pm erro padrão da média, a diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Newman-Keuls, * $p < 0,02$ vs NPS. Legenda: G1: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G2: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G3: Nutracêutico ACP trat. p/ 60 dias, G4: Promater[®] tratados p/ 30 dias, G5: Promater[®] tratados p/ 60 dias, G6: Água destilada trat. p/ 30 dias, G7: Água destilada trat. p/ 60 dias



Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 2 - Ganho médio do peso dos animais dos grupos controles. Os dados expressam média \pm erro padrão da média, a diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Newman-Keuls, * $p < 0,02$ vs NPS.

Legenda: G1: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G2: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G3: Nutracêutico ACP trat. p/ 60 dias, G4: Promater® tratados p/ 30 dias, G5: Promater® tratados p/ 60 dias, G6: Água destilada trat. p/ 30 dias, G7: Água destilada trat. p/ 60 dias



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os ratos testados com ACP® tiveram um ganho de peso absoluto significativo no decorrer das semanas do experimento ($p < 0,02$ em relação ao grupo controle negativo) como mostra o gráfico 3, porém como a diferença entre as médias dos grupos não foi muito grande pode se afirmar que não interferiu na espermatogênese. Sendo um resultado favorável pois, estudos mostram que existe associação entre a gordura corporal do pai e a prevalência de obesidade em suas crias. Em animais, o pai obeso condiciona, na prole, a homeostase da glicose insulina, a lipogênese hepática e a diminuição do potencial reprodutivo da prole masculina com o estresse oxidativo espermático e disfunções mitocondriais, dentre outros fatores. Ornellas *et al.*, 2017, concluem que mecanismos epigenéticos atuando sobre os ácidos nucleicos são as ferramentas para a explicação da transmissão de fenótipos do pai para a prole.

Tabela 1- Variação semanal da massa corporal da média (g) dos ratos durante a realização do estudo, por grupo. Os dados expressam média \pm erro padrão da média, a diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA one-way) seguida

doteste de Newman-Keuls, *** $p < 0,0001$ vs NPS. * indica o dia da eutanásia. G1: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G2: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G3: Nutracêutico ACP trat. p/ 60 dias, G4: Promater® tratados p/ 30 dias, G5: Promater® tratados p/ 60 dias, G6: Água destilada trat. p/ 30 dias, G7: Água destilada trat. p/ 60 dias

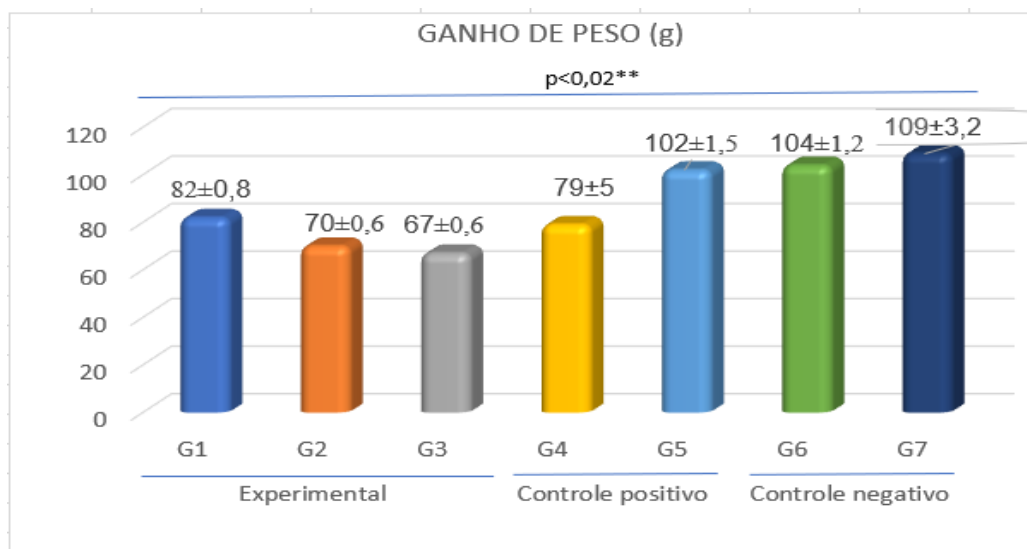
Grupos	Basal (g) Dia 1	Final (g) Dia 30 ou 60*	Varição (%)	p
G1: Nutracêutico ACP® tratados p/ 30 dias	258,4 ± 27,5	340,2 ± 30,5	(81,8%) 24,0g	<0,001***
G2: Nutracêutico ACP® tratados p/ 30 dias (residual)	353,4 ± 26,5	423,3 ± 31	(69,9%) 16,5g***	
G3: Nutracêutico ACP® tratados p/ 60 dias	302,1 ± 29,0	369,0 ± 22,5	(67,0%) 18,2g***	
G4: Promater® tratados p/ 30 dias	261,1 ± 18,0	339,8 ± 41	(78,7%) 23,2g	
G5: Promater® tratados p/ 60 dias	265,5 ± 33,0	367,0 ± 26,5	(101,5%) 27,7g	
G6: Água destilada tratados p/ 30 dias	242,2 ± 32,5	316,0 ± 39	(73,8%) 27,4g	
G7: Água destilada tratados p/ 60 dias	279,5 ± 16	369,2 ± 35	(89,7) 24,3	
Média Geral	280,3 ± 26,0	360,6 ± 32,21	(80,3) 22,3	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação aos parâmetros seminais com a obesidade, foi relatada redução na produção de espermatozoides na população de ratos obesos quando comparados aos ratos de peso normal, e efeito negativo na mobilidade e concentração total de espermatozoides (PAASCH *et al.*, 2010; CHAVARRO *et al.*, 2010; HAMMOUD *et al.*, 2008). Quanto à morfologia, nenhuma relação direta foi encontrada, porém, o índice de fragmentação do DNA espermático pode estar aumentado em indivíduos obesos em relação a indivíduos com peso normal (CHAVARRO *et al.*, 2010.), o que sugere que esta condição pode chegar a comprometer a integridade do material genético do espermatozoide.

Gráfico 3 - Variação da massa corporal da média (g) dos ratos durante a realização do estudo, por grupo. Os dados expressam média ± erro padrão da média, a diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Newman-Keuls, ** $p < 0,02$ vs NPS. Legenda: G1: Nutracêutico

ACP tratados p/ 30 dias, G2: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G3: Nutracêutico ACP trat. p/ 60 dias, G4: Promater® tratados p/ 30 dias, G5: Promater® tratados p/ 60 dias, G6: Água destilada trat. p/ 30 dias, G7: Água destilada trat. p/ 60 dias



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Avaliação dos Parâmetros Espermáticos

A avaliação da qualidade seminal constitui um dos primeiros aspectos a ser avaliado na investigação de infertilidade dos casais, sendo recomendada mesmo em trabalhos que sugerem baixo poder diagnóstico dos valores de referência dos parâmetros seminais (COZZOLINO *et al.*, 2001; ÁLVAREZ *et al.*, 2003). Embora a análise seminal (AS) não seja, isoladamente, considerada fundamental para o diagnóstico de infertilidade masculina (GUZICK *et al.*, 2001), ela assume importante papel na avaliação de pacientes com história prévia de gravidez e que, no presente momento, apresentam queixas de infertilidade secundária (PASQUALOTTO *et al.*, 2006).

Os resultados dos grupos testes e controles para os parâmetros espermáticos estudados: morfologia, motilidade e vigor dos espermatozoides estão demonstrados nos gráficos 4, 5 e 6 e na tabela 2.

5.2.1 Motilidade espermática

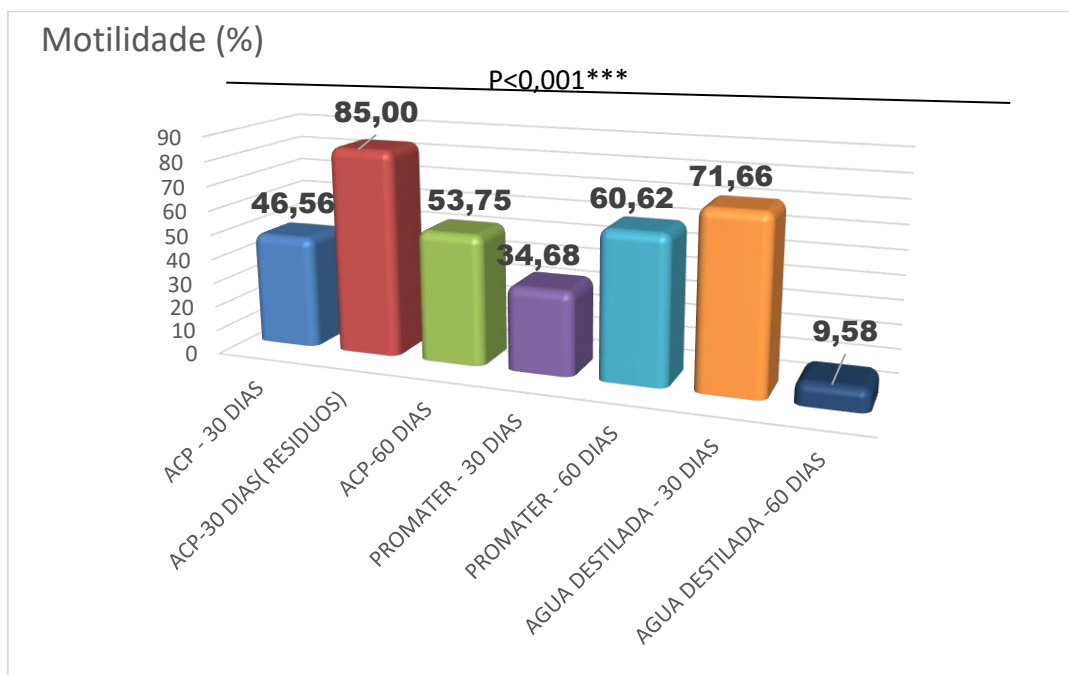
Em relação a motilidade que é a maneira pelo qual os espermatozoides estão ainda se movimentando no esfregaço (a fresco) após a retirada da cabeça do epidídimo. De acordo com o gráfico 4, os resultados da média entre o testículo direito e o esquerdo, os grupos de teste ACP® tiveram os seguintes resultados médios G1(ACP® 30 dias) = 46,6%; G2(ACP® 30 dias (resíduos) = 85,0 % e G3(ACP® 60 dias) = 53,7 %. Sendo o ACP® 30 dias (resíduos) aquele que teve o melhor desempenho quando comparado aos grupos ACP® 30 dias, ACP® 60 dias e grupos controles positivos e negativo.

Observando esses resultados poderíamos inferir que o tratamento foi capaz de melhorar a motilidade no grupo do ACP comparados com o padrão do CBRA (2013) que traz os valores de motilidade acima de 70%, o que provavelmente ocorreu pela excreção da mesma, após a biotransformação da mesma pelo trato reprodutivo, quando se compara com os controles do experimento. Esse fato pode ser demonstrado observando-se os resultados dos grupos G1 e G3 tratados de forma contínua por 30 e 60 dias, respectivamente que tiveram resultados inferiores a 50% e, também com o grupo G6 que recebeu apenas água destilada durante 30 dias teve 72% de motilidade, observasse nesse grupo que houve uma diminuição da motilidade que precisa ser melhor investigada na comparação com os outros parâmetros e com os controles.

O grupo PROMATER (60 dias) teve uma motilidade média de aproximadamente 61% e foi melhor do que aquele tratado com a mesma substância por 30 dias, porém com desempenho abaixo dos grupos tratados com ACP 30 dias resíduos(G2). O grupo da água destilada tratado por 30 dias, controle negativo, que teve como resultado 72% de motilidade média, foi também inferior ao grupo G2.

Outro fator que pode ter contribuído para uma motilidade baixa pode ter ocasionado dos espermatozoides retirados da cabeça do epidídimo, pois cada região do epidídimo apresenta funções distintas, sendo que o segmento inicial está relacionado com a absorção de fluidos vindos do testículo, as regiões da cabeça e corpo estão envolvidas com os processos iniciais e tardios de maturação espermática, como a aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de reconhecimento e fertilização do ovócito, enquanto que a região da cauda está associada com o armazenamento espermático e com a fagocitose de espermatozoides anormais (ROBAIRE; VIGER, 1995; CORNWALL, 2009).

Gráfico 4 - Motilidade dos espermatozoides proveniente dos testículos direito e esquerdo de ratos *Ratus norvegicus* por grupo. Os dados expressam média \pm erro padrão da média, a diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Newman-Keuls, * $p < 0,0001$ vs NPS**



Fonte: Elaborada pelo autor.

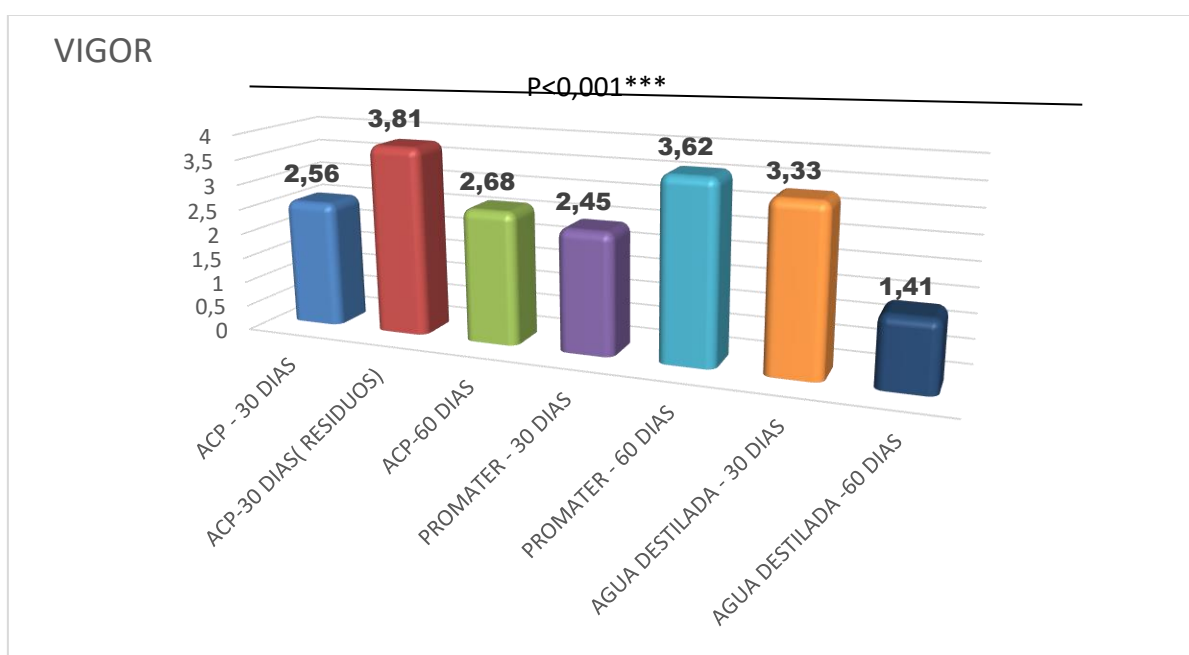
5.2.2 Vigor espermática

O vigor que se leva em consideração a direção ordenada que os espermatozoides se movimentam no esfregaço, temos aqui a numeração que vai de 0 a 5, sendo 0 a ausência de movimento progressivo com deslocamento de cauda lateral fraco e inexpressivo e 5 resulta em movimento vigoroso e veloz do espermatozoide, geralmente progressivo (CBRA,2013).

Comparando com os parâmetros de cães e caprinos de acordo com o manual para exame andrológica e avaliação animal (CBRA, 2013), os resultados normais para o vigor é de 3, tendo então os resultados dentro desses parâmetros estão no grupo de ACP® para os animais do Grupo 2, ACP (30 dias - residual), sendo a média dos testículos de aproximadamente 3,8 (gráfico 5). Confirmando o melhor

desempenho também neste parâmetro assim como na motilidade espermática. Os grupos G1 e G3 com vigor médio de 2,6 e 2,7, respectivamente, estes resultados foram bem inferiores quando comparados com o G2 e com o controle positivo (G5) e negativo (G6) que apresentaram vigor de 3,6 e 3,3 respectivamente.

Gráfico 5 - Vigor dos espermatozoides proveniente dos testículos direito e esquerdo de ratos *Ratus norvegicus* por grupo. Os dados expressam média \pm erro padrão da média, a diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Newman-Keuls, * $p < 0,0001$ vs NPS**



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.3 Morfologia espermática

Em relação a morfologia encontrados no esfregaço, sabendo que os espermatozoides normais do rato wistar possuem cabeça falciforme e cauda alongada (EDDY E O'BRIEN,1994) como mostra a figura 4, temos aqui a porcentagem daqueles que se encontram sem defeitos ou alterações, os demais percentuais se encontram aqueles com alguma anormalidade.

Comparando com os parâmetros de cães e caprinos de acordo com o manual para exame andrológica e avaliação animal (CBRA, 2013), os resultados normais para a espermatozoides normais é de 80%, tendo então resultados dentro desses

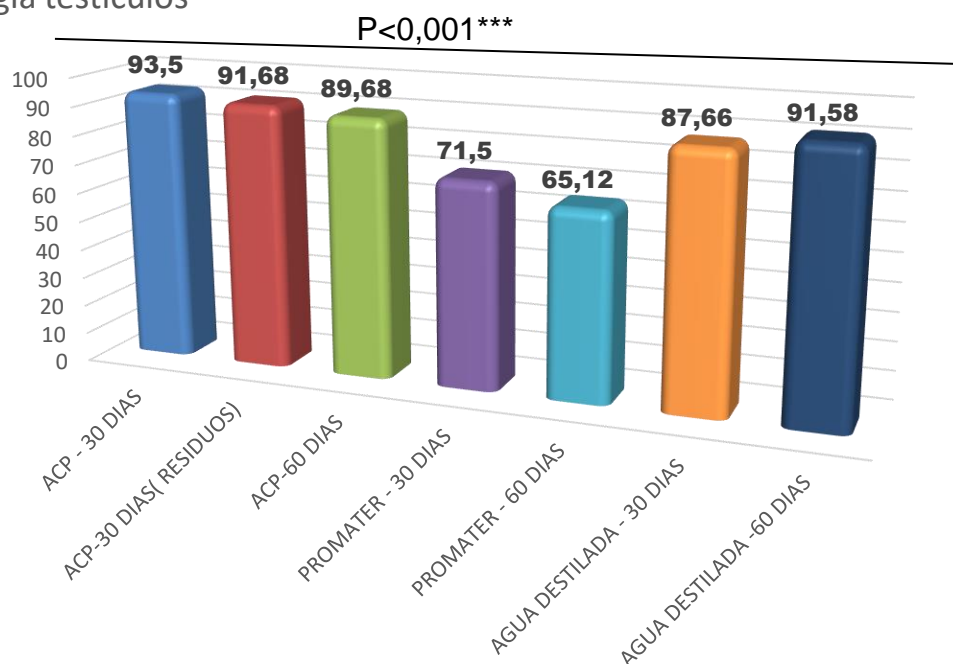
parâmetros em todos os grupos de ACP[®], sendo que os animais do Grupo 1, ACP[®] (30 dias), de acordo com a tabela 3, com valores de média de 93,5 % para os testículos, como mostra o gráfico 2.

A morfologia do testículo esquerdo do grupo 2, ACP[®] (aplicação em 30 dias e Resultado em 60 dias), foi tão superior quanto o grupo 1, com valores de $93,25 \pm 2,755\%$ usando a tabela 2 onde se compara os parâmetros entre esses dois resultados podem ser considerados estatisticamente diferentes entre si, e nesse caso esse grupo mais uma vez está entre os melhores resultados como foi com o vigor e motilidade.

O grupo 5(PROMATER[®]60 dias) se encontra fora do parâmetro comparado que é de 80%, tendo assim as piores médias em comparação aos grupos estudados (ACP[®]) com valores de média de 65,12%, como mostra o gráfico 6. O grupo 4 também está abaixo dos parâmetros normais para a morfologia.

Gráfico 6 - Morfologia normal dos espermatozoides proveniente dos testículos direito e esquerdo de ratos Ratus norvegicus por grupo. Os dados expressam média \pm erro padrão da média, a diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Newman-Keuls, * $p < 0,0001$ vs NPS**

Morfologia testiculos



Fonte: Elaborada pelo autor.

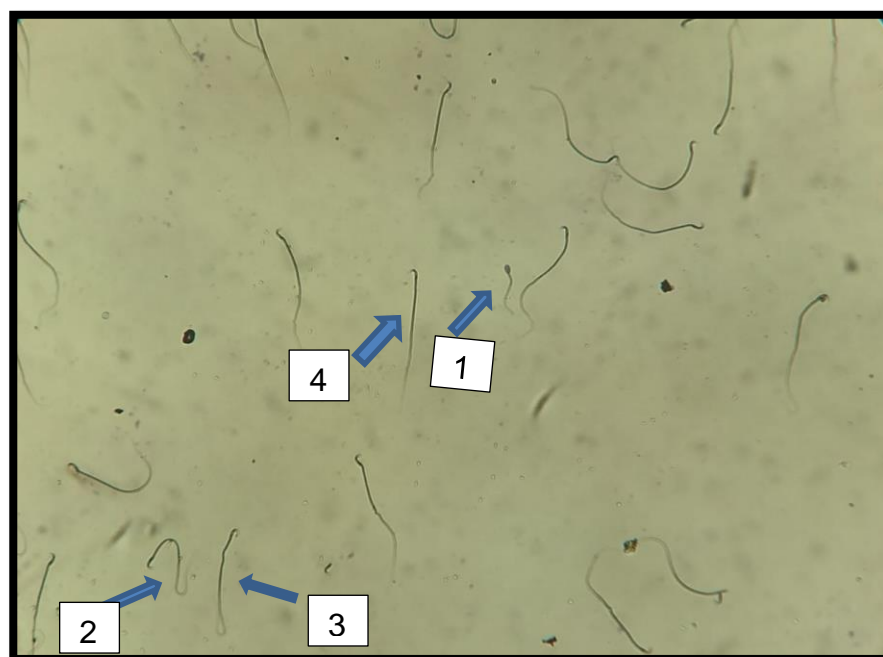
Tabela 2 - Parâmetros espermáticos dos testículos direito e esquerdo de ratos Wistar por grupo. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$. G1: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G2: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G3: Nutracêutico ACP trat. p/ 60 dias, G4: Promater® tratados p/ 30 dias, G5: Promater® tratados p/ 60 dias, G6: Água destilada trat. p/ 30 dias, G7: Água destilada trat. p/ 60 dias

Grupos	Testículo Direito			Testículo Esquerdo		
	Motilidade (%)	Vigor	Morfologia normal	Motilidade (%)	Vigor	Morfologia normal
G1	43,1 ± 21,5 ^c	2,5 ± 1,1 ^b	94 ± 3,1 ^f	50 ± 16,9 ^c	2,6 ± 0,5 ^c	93,0 ± 2,5 ^e
G2	86,3 ± 7,4 ^f	4,0 ± 0 ^g	90,1 ± 3,0 ^d	83,8 ± 10,6 ^g	3,6 ± 0,5 ^c	93,3 ± 2,3 ^f
G3	53,1 ± 30,0 ^e	2,8 ± 1,5 ^d	89 ± 2,9 ^c	54,4 ± 28,2 ^d	2,6 ± 1,1 ^c	90,4 ± 3,1 ^c
G4	39,4 ± 24,7 ^b	2,6 ± 0,9 ^c	73 ± 13,8 ^b	30 ± 22,2 ^b	2,3 ± 0,8 ^b	70,0 ± 12,4 ^b
G5	47,5 ± 23,2 ^d	3,3 ± 1,5 ^f	62,5 ± 9,6 ^a	73,8 ± 23,3 ^e	4,0 ± 1,1 ^d	67,8 ± 10,4 ^a

G6	64,2 ± 15,0 ^c	3,0 ± 0,6 ^e	87,7 ± 9,2 ^b	79,1 ± 6,7 ^f	3,7 ± 0,5 ^c	87,7 ± 1,9 ^b
G7	10 ± 6,3 ^a	1,3 ± 1,0 ^a	90,5 ± 6,6 ^e	9,2 ± 8,0 ^a	1,5 ± 1,4 ^a	92,7 ± 4,7 ^d

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 - Esfregaço úmido para avaliação da morfologia dos espermatozoides de ratos (100x). As setas indicam presença de anormalidade. 1 - Cabeça anômala; 2 - Cauda ligeiramente dobrada; 3 - Cauda enrolada; 4 - Espermatozoide normal



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Contagem Espermática

Levando em consideração as médias apresentadas e assumindo a normalidade e homoscedasticidade dos dados, o quadro 2, também apresenta uma comparação de médias por pares entre os grupos experimentais, a fim de investigar se as diferentes médias apresentam significância estatística. Esta comparação é analisada pelo valor p. Valores de $p < 0,05$ representam diferença estatisticamente significativa.

Os resultados foram classificados de acordo com três critérios: número total de espermatozoides, espermatozoides viáveis, e concentração espermática, com valores médios comparados entre si. O grupo 2 possui resultados mais significativos pois apresenta uma porcentagem de espermatozoides viáveis acima de todos os grupos (88,4%), sendo inferior apenas ao grupo controle negativo, comprovando a eficiência do nutracêutico na qualidade espermática.

Quadro 2 - Médias por grupo das quantidades médias de espermatozoide, espermatozoides viáveis e concentrações espermáticas dos ratos. G1: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G2: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G3: Nutracêutico ACP trat. p/ 60 dias, G4: Promater® tratados p/ 30 dias, G5: Promater® tratados p/ 60 dias, G6: Água destilada trat. p/ 30 dias, G7: Água destilada trat. p/ 60 dias

Grupos	Nº Total de Espermatozoides	Espermatozoides viáveis (%)	Concentração espermática (Sptz/mL)	P
G1	460.000	205.750 =44,7	230.000	<0,001***
G2	315.000	278.500 =88,4***	157.500	
G3	500.000	271.750 =54,5	250.000	
G4	320.000	105.500 = 33,0	160.000	
G5	590.000	363.000 = 61,5	295.000	
G6	326.667	223.667 = 68,5***	163.333	
G7	400.000	36.333,33 = 9,8%	200.000	

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Avaliação dos órgãos sexuais e anexos

Foram feitas avaliações dos órgãos sexuais (testículos) e anexos (próstata e vesícula seminal) através da massa desses e a avaliação macroscópico e microscópica com a histopatologia.

5.4.1 Massa dos órgãos sexuais e anexos

Os órgãos não apresentaram variação estatística entre os grupos como mostra a tabela 3.

Tabela 3 - Massa dos órgãos sexuais e anexos (g) dos ratos. Os dados expressam média \pm erro padrão da média, a diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Newman-Keuls, * $p < 0,0001$ vs NPS. G1: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G2: Nutracêutico ACP tratados p/ 30 dias, G3: Nutracêutico ACP trat. p/ 60 dias, G4: Promater® tratados p/ 30 dias, G5: Promater® tratados p/ 60 dias, G6: Água destilada trat. p/ 30 dias, G7: Água destilada trat. p/ 60 dias**

Grupos	TESTICULOS (g)	PRÓSTATA (g)	VES. SEMI. (g)	P
G1: Nutracêutico ACP® tratados p/ 30 dias	1,71 \pm 0,08	0,42 \pm 0,25	0,56 \pm 0,20	<0,001 ***
G2: Nutracêutico ACP® tratados p/ 30 dias (residual)	1,69 \pm 0,12	0,45 \pm 0,05	0,53 \pm 0,12	
G3: Nutracêutico ACP® tratados p/ 60 dias	1,78 \pm 0,07	0,47 \pm 0,1	0,67 \pm 0,17	
G4: Promater® tratados p/ 30 dias	1,51 \pm 0,2	0,31 \pm 0,11	0,53 \pm 0,18	
G5: Promater® tratados p/ 60 dias	1,75 \pm 0,07	0,51 \pm 0,15	0,70 \pm 0,3	
G6: Água destilada tratados p/ 30 dias	1,94 \pm 0,14	0,65 \pm 0,033	0,75 \pm 0,2	
G7: Água destilada tratados p/ 60 dias	1,71 \pm 0,14	0,53 \pm 0,14	0,75 \pm 0,12	
Média Geral	1,72 \pm 0,11	0,22 \pm 0,11	0,56 \pm 0,18	

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4.2 Avaliação macroscópica

Todos os órgãos dos ratos dos grupos estudados não apresentaram lobulação e tiveram suas cores e consistência dentro do padrão normal.

5.4.3 Avaliação Histopatológica

A avaliação histopatológica é feita com a função de encontrar as patologias presentes nos órgãos para determinar a influência na avaliação final da espermatogênese, aprofundando o que não conseguiu ser detectado na avaliação macroscópica. O exame histopatológico consiste, então, na análise microscópica

dos tecidos para a detecção de possíveis lesões existentes, com a finalidade de informar ao clínico a natureza, a gravidade, a extensão, a evolução e a intensidade das lesões, além de sugerir ou até mesmo confirmar a causa da afecção. As principais alterações no estudo histopatológico foi a congestão, o infiltrado inflamatório, o edema e a degeneração como mostra a figura 5. Os órgãos estudados foram os testículos, próstata e vesícula seminal.

Quadro 3 - Exame histopatológico das glândulas anexas (próstata e vesícula seminal) e testículos. *- maioria severa ** - maioria média * - maioria mínima.**

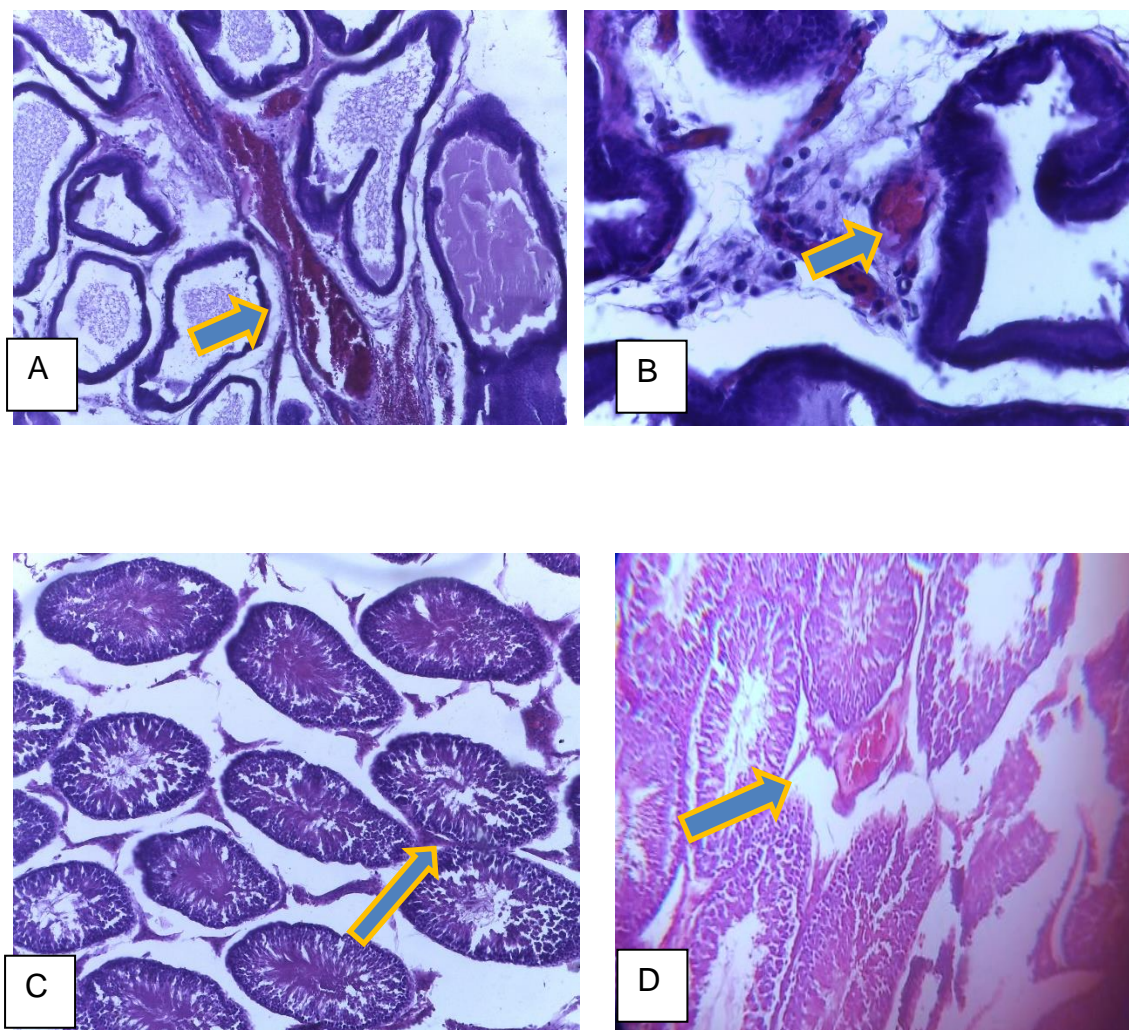
Grupo	Histopatologia	Próstata (%)	Testículos (%)	Vesícula (%)
G1: ACP® 30 DIAS	Congestão	100,0*	100,0***	100,0**
	Infiltrado Inflamatório	62,5***	-	-
	Edema	-	87,5**	-
	Degeneração	-	37,5*	-
G2: ACP® 30 DIAS (RESIDUAL)	Congestão	100,0***	100,0***	100,0***
	Infiltrado Inflamatório	50,0***	-	-
	Edema	-	100,0***	-
	Degeneração	-	25,0****	-
G3: ACP® 60 DIAS	Congestão	100,0***	100,0**	100,00***
	Infiltrado Inflamatório	100,0***	-	-
	Edema	-	100,0**	-
	Degeneração	-	-	-
G4: PROMATER® 30 DIAS	Congestão	100,0*	100,0**	100,0***
	Infiltrado Inflamatório	62,5**	-	-
	Edema	-	100,0**	-
	Degeneração	-	-	-
G5: PROMATER® - 60 DIAS	Congestão	100,0**	100,0**	100,0***
	Infiltrado Inflamatório	12,5**	-	-
	Edema	-	100,0**	-
	Degeneração	-	25,0**	-
G6: ÁGUA DESTILADA 30 DIAS	Congestão	75,0***	75,0**	75,0***
	Infiltrado Inflamatório	37,5***	-	-
	Edema	-	-	-
	Degeneração	-	-	-
G7: ÁGUA DESTILADA - 60 DIAS	Congestão	75,0***	75,0**	25,0***
	Infiltrado Inflamatório	25,0***	-	-
	Edema	-	-	-
	Degeneração	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com a quadro 3, os grupos do ACP® com poucas alterações ou alterações mínimas na próstata, testículos e vesícula seminal foram o grupo 2, e o

grupo 1- ACP® (30 dias) tiveram alterações entre severo a moderada, sendo agravante na congestão da próstata que a maioria teve intensidade severa além de ser o único grupo do experimento que teve a vesícula seminal com congestão severa. O grupo 3 - ACP® (60 dias) que apesar de sua totalidade com patologia nos órgãos, possuem intensidade mínima nos órgãos estudados nos ratos. Os grupos contendo PROMATER® foram aqueles que tiveram mais alterações severas e os grupos de controle para água destilada os órgãos ou tiveram intensidade mínima ou não teve alterações para os três órgãos estudados.

Figura 5 - Fotomicrografia da avaliação histopatológica dos órgãos reprodutivos. Legenda: Congestão da Próstata (100x) B- Infiltrado Inflamatório da Próstata(400x) C- Degeneração Testicular(100x) D -Edema Testicular(100x).



6 CONCLUSÃO

A partir do presente estudo pode se objetivar o trabalho, afirmando que o nutracêutico a base de ACP[®], após feito a avaliação teve importância significativa na espermatogênese dos ratos Wistar. Os resultados da avaliação da influência do ACP[®] sobre a espermatogênese permitem afirmar que o uso do nutracêutico ACP[®] não teve interferência no ganho de peso no decorrer do experimento, não havendo interferência na espermatogênese.

O ACP[®] teve relevância em cada um dos tópicos suscitado: para a motilidade, morfologia e vigor, os melhores resultados foram no ACP[®] 30dias resíduos(grupo2). Então há significância no uso do ACP[®] 30dias resíduos ficando acima dos valores normais gerais.

Em relação a variável quantidade de espermatozoides, tem os melhores valores em relação ao ACP[®] (30 dias - resíduos) no quesito principal que era os espermatozoides viáveis.

Há necessidade de maiores estudos, com experimentos e mais outras investigações acerca de outros fatores da aplicação do ACP[®] da espermatogênese, além de ter a avaliação da morfologia da célula de Leydig, integridade da membrana e o estudo com os órgãos de metabolização, tendo assim parâmetros finais para a fertilidade dos animais.

Com isso exposto, entende-se a importância do estudo do nutracêutico a base de água de coco para melhoria das funções corporais, em especial a espermatogênese em ratos wistar.

REFERÊNCIAS

ALARCÓN, M. L.; MENDIOLA, J.; LÓPEZ-ESPÍN, J.J. Dietary intake of antioxidant nutrients is associated with semen quality in young university students. **Rev. Human Reproduction.** , [s. l.], 2012.

ALMEIDA, L.M. Quantificação histológica da espermatogênese de ratos wistar tratados com dimetil sulfóxido (dmso). **Rev. Archives of Veterinary Science**, [s. l.], 1997.

ALMEIDA, L.M.; WEISS, R.R.; CASTRO, C.S. Quantificação histológica da espermatogênese de ratos wistar tratados com dimetil sulfóxido. **Rev. Archives of Veterinary Science**, [s. l.], 2000.

ÁLVAREZ, C.; CASTILLA, J.; MARTÍNEZ, L.; RAMÍREZ, J.P.; VERGARA, F.; GAFORIO, J.J. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. **Rev. Hum Reprod.** [S. l.: s. n.], 2000.

ANDLAUER, W.; FURTS, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and Outlook. **Rev. Food Research International.** [S. l.: s. n.], 2002.

ANWAY, M.D.; CUPP, A.S; UZUMCU, M. Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. **Rev. Science.** [S. l.: s. n.], 2005.

ARAGÃO, W.M. A importância do coqueiro-anão verde. **Rev. Petrolina: Embrapa, (Coletâneas Rumos & Debates).** [S. l.: s. n.], 2000. Disponível: <http://www.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf/0/85bc576bec325c7c832569040048cb84>. Acesso: 20 de outubro de 2020.

ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. O. Água de - coco. **Rev. Embrapa CPATC/ Tabuleiros Costeiros**, Aracaju, 2001.

ARRUDA, R.P.; SILVA D.F.; AFFONSO, F.J.; LEME, S K.M.; JAIMES, J.D.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z., NASCIMENTO J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, 2011.

ASRM – American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic Evaluation of the infertile male: a committee opinion. **Rev. Fertility and sterility**. 2015.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. Técnicas de citologia e histologia. **Livro Técnico**. Rio de Janeiro, 1976.

BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis a review. **Rev. Fertility and sterility** .1977.

BIOTERIO CENTRAL. Disponível em: <http://www.ufal.edu.br/bioterio/animais-reproduzidos>, Acesso: 20 de março de 2020.

BIOTERIO CENTRAL. Disponível em: <https://www4.unievangelica.edu.br/lab/bioterio-central/animais>. Acesso em: 29 de março de 2022.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Rev. Fertility and sterility** 1973.

BORGES, E.J. Guia Da Infertilidade Masculina. Diretor Científico do Fertility Medica Group. **Rev. Fertility and sterility**. 2022.

BUFFONE, M. G.; WERTHEIMER, E. V.; VISCONTI, P. E. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. **Rev. Biochimica et Biophysica Acta**. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25066614>. Acesso: 20 de março de 2020.

CARRELL, D. T.; ASTON, K. I.; OLIVA, R. The “omics” of human male infertility: integrating big data in a systems biology approach. **Rev. Cell and Tissue Research**. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26661835>. Acesso: 20 de março de 2020.

CARVALHO, M.J; MAIA, A.G.; SOUSA, M.P.H.; JR, M.A.G. Água de coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Rev. Semina: Ciências agrárias**, Londrina. 2006.

CASTAÑEDA, O. J. R. Água de coco em pó (ACP 406®) como meio de cultivo base para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos no tecido ovariano. **Rev. Reprodução animal**. Minas gerais, 2018.

CHAVARRO, J.E.; TOTH, T.L.; WRIGHT, D.L.; MEEKER, J.D.; HAUSER, R. Índice de massa corporal em relação à qualidade do sêmen, integridade do DNA espermático e níveis séricos de hormônios reprodutivos entre homens atendidos em uma clínica de infertilidade. **Rev. Fertilidade e Esterilidade**. 2010.

CLERMONT, Y.; HARVEY, S.C. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized hormone treated albino rats. **Rev. Endocrinology**. 1965.

CLERMONT, Y.; HARVEY, S.C. Effects of hormones on spermatogenesis in the rat. **Rev. Endocrinology**. 1967.

CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P.; MESSIER, B. Durée du cycle de l'épithelium séminal du rat. Arch. Anat. **Rev. Microsc. Morphol**. 1959.

COCHRAN, W.G. Sampling techniques. **Rev. New York: John Wiley and Sons**. 2ed. 1965.

COHEN, J. Statistical power analysis for behavior science. **Rev. New York: Lawrence Erlbaum Associates**. 2ed. 1988.

COLAGAR, A. H.; MARZONY, E. T.; CHAICHI, M. J. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. **Rev. Nutrition Research**. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19285597>>. Acesso: 20 de março de 2020.

COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Rev. Brasileira de Medicina Veterinária**. 2002.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Rev. Hum Reprod**. 2009.

COSTA, D.R.; BOTANA, D.; PIÑERO, S. Cadmium inhibits motility, activities of plasma membrane Ca (2+)-ATPase and axonemal dynein-ATPase of human spermatozoa. **Rev. Andrologia**. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26259968>. Acesso: 20 de março de 2020.

COZZOLINO, D.J.; LIPSHULTZ, L.I. Varicocele as a progressive lesion: positive effect of varicocele repair. **Rev. Hum Reprod**. 2001.

CUENCA, M. A. G. Importância econômica do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). A cultura do coqueiro no Brasil. **Rev. Brasília: Embrapa - Serviço de Produção de Informação**. 2.ed. 1998

DEFELICE, L. S. The nutraceutical revolution, its impact on food industry. **Rev. Trends in Food Sci. and Tech**. 1995.

DOHLE, G. R.; SMIT, M.; WEBER, R. F. Androgens and male fertility. **Rev. World Journal of Urology**. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14566423>. Acesso: 20 de março de 2020.

EDDY, E.M., O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E., NEIL, J.D. (Eds.), **Rev. The physiology of reproduction**. New York, 1994.

ELKINA, Y. L.; ATROSHCHENKO, M. M.; BRAGINA, E. E. Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase decreases sperm motility. **Rev. Biochemistry**, v. 76, n. 2, p. 268-272, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21568861>. Acesso: 20 de março de 2020.

FEPG: Fórum de Ensino Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de Montes Claros. Disponível em: <http://www.fepeg2012.unimontes.br/?q=printpdf/resumo/rela%C3%A7%C3%A3oent-re-suplementa%C3%A7%C3%A3o-alimentar-com-micronutrientes-antioxidantes-e-qualidade-seminal>. Acesso em: 22 de junho de 2020.

FERRAMOSCA, A.; PROVENZANO, S. P.; MONTAGNA, D. D. Oxidative Stress Negatively Affects Human Sperm Mitochondrial Respiration. **Rev. Journal of**

Urology, v. 82, n. 1, p. 78-83, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23806394>. Acesso em: 22 de junho de 2020.

FILAPPI, A. Qualidade seminal e histomorfometria dos órgãos reprodutivos de ovinos tratados com fluoreto de sódio. **Rev. Cienc. Rural [online]**. 2008.

FONTES, H. R. Perspectivas para a produção de biodiesel a partir de óleo de coco. **Rev. Reprodução animal**. <http://www.ambienteemfoco.com.br/?p=774>. Acesso em: 31 de julho de 2019.

GARCIA, O.S. Características físicas e morfológicas do sêmen de touros normais e de touros com distúrbios reprodutivos, de raças europeias e indianas criadas no estado de Minas Gerais. **Rev. Reprodução animal**. Belo Horizonte, UFMG, 1971.

GONÇALVES, N.R.; DIAS, F.L. Análise da influência do alcoolismo e tabagismo na fertilidade masculina. **Rev. Scientia Plena**. 2016.

GRAÇA, C.; BAGGIO, C. H. ; FREITAS, C.S.; SOUZA, R.Y.D. Avaliação *in vivo* da segurança e dos mecanismos subjacentes ao relaxamento *in vitro* induzido por *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker na traqueia de rato. **Journal of Ethnopharmacology**. Volume 112, Edição 3. 2007.

GUZICK, D.S.; OVERSTREET, J.W.; FACTOR-LITVAK, P.; BRAZIL, C.K.; NAKAJIMA, S.T.; COUTIFARIS, C. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. **Rev. N Engl J Med**. 2001.

HAMAD, M. F.; SHELKO, N.; KARTARIUS, S. et al. Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. **Rev. Andrology**. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044670>. Acesso em: 22 de junho de 2020.

HAMMOUD, A.O.; WILDE N, G. M.; PARKS, A.; CARRELL, D.T.; MEIKLE, A.W. Obesidade masculina e alteração nos parâmetros espermáticos. **Rev. Fertil Estéril**. 2008.

HUCKINS, C. Duration of spermatogenesis in pre- and postpuberal Wistar rat. **Rev. Anat**. 1965.

KASVI, Disponível em: <<https://kasvi.com.br/como-e-realizada-contagem-de-celulas>>. Acesso em: 22 de junho de 2020.

KITA, D.H. Efeitos Do Pesticida Roudup® Sobre O Sistema Reprodutor De Ratos Wistar. **Rev. Reprodução animal**. Curitiba 2004

KOLAHDOOZ, M.; NASRI, S.; MODARRES, S. Z. Effects of Nigella sativa L. seed oil on abnormal semen quality in infertile men: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Rev. Phytomedicine**. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24680621>>. Acesso em: 22 de junho de 2020.

KRAUCHUNAS, A. R.; MARCELLO, M. R.; SINGSON, A. The molecular complexity of fertilization: Introducing the concept of a fertilization synapse. **Rev. Molecular Reproduction and Development**. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26970099>>. Acesso em: 22 de junho de 2020.

LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **Journal of Food Science**. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23789932>>. Acesso em: 22 de junho de 2020.

LUNA, N. Infertilidade e ausência de filhos: a origem do drama. In: Provetas e clones: uma antropologia das novas tecnologias reprodutivas. **Rev. Antropologia e Saúde collection**, Rio de Janeiro, FIOCRUZ, ano 2007, ed. ISBN 978-85-7541-355-5., p. pp. 53-81 .2007.

MENDELUK, G.R.; COHEN, M.I.; FERRERI, C.; CHATGILIALOGLU, C. Nutrition and reproductive health: sperm versus erythrocyte lipidomic profile and ω -3 intake. **J. Rev. Nutr. Metabol**. 2015.

MIES FILHO. Avaliação Da Capacidade Reprodutiva. **Rev. Embrapa**. 1975. Disponível em: <https://old.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc51/03avaliacaocapacidade.html>. Acesso em: 29 de março de 2022.

MIKI, K.; QU, W.; GOULDING, E. H.; WILLIS, W. D. *et al*. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for

sperm motility and male fertility. **Rev. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546993>. Acesso em: 29 de março de 2022.

MORETTO, L.D.; STEPHANO, M.A. Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas – 421 Teste de triagem de reprodução /desenvolvimento de toxicidade. **Rev. Métodos Alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil**. São Paulo. 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger / David L. Nelson, Michael M. Cox ; [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga et al. ; revisão técnica: Carlos Termignoni [et al.]. **Rev. Reprodução animal**. Porto Alegre, 2014.

NEVES, S.M.P.; FILHO, J. M.; MENEZES, E.W. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. **Rev. Reprodução animal**. Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Instituto de Química (FCF-IQ/USP).2013

NUNES, A. K.R.; GOUVEIA, B. B.; MATOS, M. H. T., PIRES, I. C.; Análise Morfológica E Funcional Do Processo Espermatogênico Em Cobaios (*Cavia Porcellus*) Da Pré-Puberdade Até A Pós-Puberdade. **Rev. Reprodução animal**. 2013.

ORNELLAS, F.; CARAPETO, P.V.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; AGUILA, M.B. Obese fathers lead to an altered metabolism and obesity in their children in adulthood: review of experimental and human studies. **Rev. J Pediatr**. 2017.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-De REVIERS, M.T. Espermatogénese en los mamíferos domésticos. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. Reproduccion de los animales domésticos. **Rev. Zaragoza, Editorial Acribia, 3 ed.** 1984.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli-cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells

produced during perinatal development. **Rev. Endocrinology**, v.122, p.787-794, 1988.

PARK, H. J.; CHOE, S.; PARK, N. C. Effects of Korean red ginseng on semen parameters in male infertility patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical study. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 22, n. 7, p. 490 – 495. 2015.

PASQUALOTTO, E. B.; FERREIRA, R. V.; FONSECA, G. P.; ZAGO, B. E.; GARBIN JÚNIOR, C.; PASQUALOTTO, F. F. A análise seminal deve ser requisitada para homens com histórico de fertilidade prévia? **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2006.

PAASCH, U.; GRUNEWALD, S.; KRATZSCH, J.; GLANDER, H.J. A obesidade e a idade afetam o potencial de fertilidade masculina. **Rev. Esteril Fértil**. 2010

RING, J. D.; LWIN, A. A.; KÖHLER, T. S. Current medical management of endocrine-related male infertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 3, p. 357–363, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27072045>. Acesso em: 29 de março de 2022.

RIO. Remessa De Peças Cirúrgicas Para Exame Histopatológico. **Rev. Reprodução animal**. Disponível em: http://www0.rio.rj.gov.br/ijv/remessa_pecas.shtm. Acesso em: 29 de março de 2022.

RISHI, R. K. Nutraceutical: borderline between food and drug. **Rev. Pharma Review**. 2006. Disponível em: <http://www.kppub.com/articles/herbal-safety-pharma-review-004/nutraceuticals-borderline-betweenfood-and-drugs.html>. Acesso em: 29 de março de 2022.

ROBAIRE, B.; VIGER R.S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. **Rev. Biol Reprod**. 52(2): 226-36, 1995.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 103-107, 1978.

ROBBINS, W. A.; XUN, L.; FITZGERALD, L. Z.; ESGUERRA, S. Walnuts improve semen quality in men consuming a western-style diet: randomized control dietary intervention trial. **Rev. Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, Article ID Article 101, p. 101–108, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22895856>. Acesso em: 29 de março de 2022.

SALES, A.K. Efeito do estresse oxidativo na qualidade do sêmen em homens. **Rev. Reprodução animal**. Vitória: [s. n.], 2016.

SAMPLASKI, M. K.; LOAI, Y.; WONG, K. Testosterone use in the male infertility population: prescribing patterns and effects on semen and hormonal parameters. **Rev. Fertility Sterility**. v. 101, p. 64–9, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028213030537>. Acesso em: 29 de março de 2022.

SANAR SAÚDE. Glândulas anexas do sistema reprodutor do macho **Rev. Reprodução animal**. Disponível em: <https://www.sanarsaude.com/portal/concursos/artigos-noticias/glandulas-anexas-do-sistema-reprodutor-do-macho>. Acesso em: 29 de março de 2022.

SANTOS, M. R. V. et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Rev. Scientia Plena** 6. 2010

SCHMIDT, L.; CHRISTENSEN, U.; HOLSTEIN, B.E. The social epidemiology of coping with infertility. **Rev. Hum Reprod**. 2005.

SCHNEIDER, D. T.; FEIJÓ, C.M.; SPAINE, D. M.; ESTEVES, S. C. Espermatogênese. **Rev. Reprodução animal**. Disponível em <http://androfert.com.br/arquivos/Espermatogênese.pdf>. Acesso em: 29 de março de 2022.

SHIADEH, M. N.; NIYYATI, M.; FALLAHI, S. Human parasitic protozoan infection to infertility: a systematic review. **Rev. Parasitology Research**, p. 469–477, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26573517>. Acesso em: 29 de março de 2022.

SILVA, L.F.; CARVALHO, F. Atualizações na infertilidade masculina. **Rev. Sociedade Portuguesa de Andrologia. SAÚDE, SÁ.** 2011. Disponível em: <http://docplayer.com.br/3054944-Atualizacoes-na-infertilidade-masculina.html>.

Acesso em: 29 de março de 2022.

SINHAHIKIM, A.P.; MAITI, B.R.; GHOSH, A. Spermatogenesis in the bandicoot rat. I. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium. **Rev. Arch. Androl.**, v. 14, p. 151-154, 1985.

SORENSEN, A.M.; SORENSEN, A.M. Animal reproduction; principles and practices. New York, McGraw Hill, 1979. 496p. **Rev. Hum Reprod.** UFRGS, 2022. Disponível em: http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/motilidade/3.3-mot/_notes/avi_prin.htm.

Acesso em: 29 de março de 2022.

SPADELLA, M. A.; CESARIO, M. D. SITE: **Roteiro De Estudo De Espermatogênese.** **Rev. Hum Reprod.** Disponível em: <https://www.famema.br/ensino/embriologia/espermatogeneseroteiro.php>. Acesso em: 29 de março de 2022.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos Reprodutivos Do Macho. IN: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Dukes. **Rev. Fisiologia dos animais domésticos.** Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S. A., 1996.

TANAKA, H.; TAKAHASHI, T.; IGUCHI, N. Ketone Bodies Could Support The Motility But Not The Acrosome Reaction Of Mouse Sperm. **International Journal Of Andrology**, v. 27, p. 172–177, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15139973>. Acesso em: 29 de março de 2022.

TOLOSA, E. M.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. Manual De Técnicas Para Histologia Normal E Patológica. **Rev. Hum Reprod.** 2 ed. São Paulo. 2003.

TREMELLEN, K.; MIARI, G.; FROILAND, D. A Randomised Control Trial Examining The Effect Of An Antioxidant (Menevit) On Pregnancy Outcome During Ivf-Icsi Treatment. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology.**

v. 47, n. 3, p. 216-21, Jun, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550489>. Acesso em: 29 de março de 2022.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. Free Radicals and Antioxidants In Normal Physiological Functions And Human Disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>. Acesso em: 25 de setembro de 2021.

VERONEZ, D. A. L. Abordagem Morfofuncional Do Sistema Reprodutor Masculino E Feminino. **Rev. Hum Reprod.** 2008.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., OCLIN, K. Computer Assisted Sêmen Analyzers In Andrology Research And Veterinary Practice. **Rev. Therio genology**, v.57, p.149-179, 2002.

VETNIL. Vetnil Indústria e Comércio De Produtos Veterinários LTDA. <http://www.vetnil.com.br>. Acesso: outubro de 2022

VIEIRA, L. F. A relação entre a suplementação alimentar com micronutrientes antioxidantes e a qualidade seminal. **Revista Presença**. <https://revistapresenca.celsolisboa.edu.br>. Acesso em: 29 de março de 2022.

VIGNERA, S.; CONDORELLI, R.; VICARI, E. Diabetes mellitus and sperm parameters. **Rev. Journal Of Andrology**, v. 33, p. 145-153, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474785>. Acesso em: 29 de março de 2022.

WESTPHAL, S.J. Alterações Histológicas Precoces Após Torção Do Cordão Espermático Em Ratos Wistar. **Rev. Hum Reprod.** Curitiba, 2000.

WRÓBLEWSKA, U. M.; KAMIŃSKI, P.; LAKOTA, P. Zinc And Iron Concentrations And Sod Activity In Human Sêmen And Seminal Plasma. **Rev. Biol Trace Elem Res**, [s. l.], 2011.

WURTMAN, J.J., MILLER, S.A. Effect Of Litter Size On Weight Gain In Rats. **Rev. Hum Reprod.** 1976.

YAO, D. F.; MILLS, J. N. Male Infertility: Lifestyle Factors And Holistic, Complementary, And Alternative Therapies. **Asian Journal of Andrology.** 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26952957>. Acesso em: 29 de março de 2022.

Anexo

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Uso de nutracêutico a base de água de coco em pó (ACP®) na espermatogênese de ratos da raça wistar*”, registrada nº 663/2020, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. ANA LYS BEZERRA BARRADAS MINEIRO** do **Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **20/11/2020**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/12/2020 a 30/06/2023
Espécie/Linhagem/raça	Rato heterogênico/ Wistar
Nº de Animais	57
Peso/ Idade	250-300g/ 2,5 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central
Local de alojamento dos animais durante o experimento	Biotério Setorial de Experimentação II - Prédio Departamento de Biofísica e Fisiologia/CCS/UFPI.
Grau de Invasividade	1

Teresina, 25 de Novembro de 2020.


 Prof.ª Ives L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

ANEXO B– REVISTA CIENTIFICA



Diretrizes para Autores

O periódico RBCV é uma publicação, com acesso e envio de artigos exclusivamente pela Internet (www.uff.br/rbcv). Editado na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminenseda, destina-se a publicação de artigos de revisão (a convite do Conselho Editorial), relato de caso (somente serão aceitos relatos que contribuam com o avanço do conhecimento na área), e pesquisas originais nas seguintes seções: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Produção Animal, Medicina Veterinária Preventiva, Patologia e Análises Clínica Veterinária, Clínica Médica e Cirúrgica e Reprodução Animal.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Conselho Editorial, com assessoria de especialistas da área (revisores ad hoc). Os pareceres têm caráter imparcial e sigilo absoluto, tanto da parte dos autores como dos revisores, sem identificação entre eles. Os artigos, cujos textos necessitam de revisões ou correções, são devolvidos aos autores e, se aceitos para publicação, passam a ser de propriedade da RBCV. Os conceitos, informações e conclusões constantes dos trabalhos são de exclusiva responsabilidade dos autores.

Os manuscritos devem ser redigidos na forma impessoal, espaço entre linhas duplo (exceto nas tabelas e figuras), fonte Times New Roman tamanho 12, em folha branca formato A4 (21,0 X 29,7 cm), com margens de três cm, páginas numeradas seqüencialmente em algarismos arábicos, não excedendo a 20, incluindo tabelas e figuras (inclusive para artigos de revisão). As páginas devem apresentar linhas numeradas (a numeração é feita da seguinte forma: menu arquivo/configurar página/layout/números de linha.../numerar linhas). Não utilizar abreviações não-consagradas e acrônimos, tais como: "o T2 foi menor que o T4, e não diferiu do T3 e do T5". Quando se usa tal redação dificulta-se o entendimento do leitor e a fluidez do texto.

Prefere-se o uso da língua inglesa nos artigos submetidos.

Citações no texto: são mencionadas com a finalidade de esclarecer ou completar as idéias do autor, ilustrando e sustentando afirmações. Toda documentação consultada deve ser obrigatoriamente citada em decorrência aos direitos autorais. As citações de autores no texto são em letras minúsculas, seguidas do ano de publicação. Quando houver dois autores, usar “e” e, no caso de três ou mais autores, citar apenas o sobrenome do primeiro, seguido de et al. (não-italico). Menciona-se a data da publicação que deverá vir citada entre parênteses, logo após o nome do autor. As citações feitas no final do parágrafo devem vir entre parênteses e separadas por ponto e vírgula, em ordem cronológica. Deve-se evitar referências bibliográficas oriundas de publicações em eventos técnico-científicos (anais de congressos, simpósios, seminários e similares), bem como teses, dissertações e publicações na internet (que não fazem parte de periódicos científicos). Deve-se, então, privilegiar artigos publicados em periódicos com corpo editorial (observar orientações percentuais e cronológicas no último parágrafo do item “Referências”).

Citação de citação (apud): não é aceita.

Língua: Portuguesa, Inglesa ou Espanhola.

Tabela: deve ser mencionada no texto como Tabela (por extenso) e refere-se ao conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. São construídas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico (Ex.: Tabela 1. Ganho médio diário de ovinos alimentados com fontes de lipídeos na dieta). Ao final do título não deve conter ponto final. Não são aceitos quadros.

Figura: deve ser mencionada no texto como Figura (por extenso) e refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. Os desenhos, gráficos e similares devem ser feitos com tinta preta, com alta nitidez. As fotografias, no tamanho de 10 x 15 cm, devem ser nítidas e de alto contraste. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico (Ex.: Figura 1. Produção de leite de vacas Gir sob estresse térmico nos anos de 2005 e 2006).

Chama-se a atenção para as proporções entre letras, números e dimensões totais da figura: caso haja necessidade de redução, esses elementos também são reduzidos e correm o risco de ficar ilegíveis. final do título não deve conter ponto final.

Tanto as tabelas quanto as figuras devem vir o mais próximo possível, após sua chamada no texto.

TIPOS E ESTRUTURA DE ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO:

1) **Artigos científicos:** devem ser divididos nas seguintes seções: título, título em inglês, autoria, resumo, palavras-chave, summary, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, agradecimentos (opcional) e referências; e

2) **Artigos de revisão:** devem conter: título, título em inglês, autoria, resumo, palavras-chave, summary, keywords, introdução, desenvolvimento, conclusões, agradecimentos (opcional) e referências.

3) **Relatos de caso:** devem conter: título, título em inglês, autoria, resumo, palavras-chave, summary, keywords, introdução, relato do caso, discussão e conclusões, agradecimentos (opcional) e referências.

Os títulos de cada seção devem ser digitados em negrito, justificados à esquerda e em letra maiúscula.

Título: Em português (negrito) e em inglês (itálico), digitados somente com a primeira letra da sentença em maiúscula e centralizados. Devem ser concisos e indicar o conteúdo do trabalho. Evitar termos não significativos como “estudo”, “exame”, “análise”, “efeito”, “influência”, “avaliação” etc.

Autores: A nomeação dos autores deve vir logo abaixo do título em inglês. Digitar o nome completo por extenso, tendo somente a primeira letra maiúscula. Os autores devem ser separados por vírgula. Todos devem estar centralizados. (Ex.: Roberto Carlos de Oliveira). A cada autor deverá ser atribuído um número arábico sobrescrito ao final do sobrenome, que servirá para identificar as informações referentes a ele. No rodapé da primeira página deverá vir justificada a esquerda e em ordem crescente a numeração correspondente, seguida pela afiliação do autor: Instituição;

Unidade; Departamento; Cidade; Estado e País. Deve estar indicado o autor para correspondência com o respectivo endereço eletrônico.

Resumo e Summary: Devem conter entre 200 e 250 palavras cada um, em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase deve ser uma informação e não apresentar citações. Deve se iniciar pelos objetivos, descrever o material e métodos e apresentar os resultados seguidos pelas conclusões. Toda e qualquer sigla deve vir precedida da explicação por extenso. Ao submeter artigos em outra língua, deve constar o resumo em português.

Palavras-chave e keywords: Entre três e cinco, devem vir em ordem alfabética, separadas por vírgulas, sem ponto final, com informações que permitam a compreensão e a indexação do trabalho. Não são aceitas palavras-chave que já constem do título.

Introdução: Deve conter no máximo 2.500 caracteres com espaços. Explicação de forma clara e objetiva do problema investigado, sua pertinência, relevância e, ao final, os objetivos com a realização do estudo.

Material e Métodos (exceto para artigos de revisão e relato de caso): Não são aceitos subtítulos. Devem apresentar seqüência lógica da descrição do local, do período de realização da pesquisa, dos tratamentos, dos materiais e das técnicas utilizadas, bem como da estatística utilizada na análise dos dados. Técnicas e procedimentos de rotina devem ser apenas referenciados. Conter número de protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Instituição de no qual o estudo foi realizado.

Resultados e Discussão (exceto para artigos de revisão e relato de caso): Os resultados podem ser apresentados como um elemento do texto ou juntamente com a discussão, em texto corrido ou mediante ilustrações. Interpretar os resultados no trabalho de forma consistente e evitar comparações desnecessárias. Comparações, quando pertinentes, devem ser discutidas e feitas de forma a facilitar a compreensão do leitor.

Conclusões: Não devem ser repetição dos resultados e devem responder aos objetivos

expressos no artigo.

Desenvolvimento (exclusivo para artigos de revisão): Deve ser escrita de forma crítica,

apresentando a evolução do conhecimento, as lacunas existentes e o estado atual da arte com base no referencial teórico disponível na literatura consultada.

Relato de Caso: neste tópico o autor deverá descrever detalhadamente o relato em questão, oferecendo ao leitor todas as informações necessárias para o seu perfeito entendimento.

Agradecimentos: O uso é opcional. Deve ser curto e objetivo.

Referências: Devem ser relacionadas em ordem alfabética pelo sobrenome e contemplar todas aquelas citadas no texto. Menciona-se o último sobrenome em maiúsculo, seguido de vírgula e as iniciais abreviadas por pontos, sem espaços. Os autores devem ser separados por ponto e vírgula. Digitálas em espaço simples, com alinhamento justificado a esquerda. As referências devem ser separadas entre si (a separação deve seguir o caminho parágrafo/espaçamento e selecione: depois seis pontos). No mínimo **50%** das referências devem ser de artigos publicados nos últimos dez anos. Referências de **livros, anais, internet, teses, dissertações, monografias**, devem ser evitadas.

INFORMAÇÕES PARA CONTATO:

Telefone: +55 21 2629-9526

E-mail: rbcv.cmv@id.uff.br

Site: www.uff.br/rbcv

Todo texto submetido à Revista Brasileira de Ciência Veterinária com vistas à publicação deverá ser acompanhado pelas licenças ou autorizações que se fizerem necessárias para atender à legislação brasileira vigente à época. Lembramos que as autorizações das quais nossos autores necessitam com maior frequência são: i) SISBIO – para trabalhos que incluam animais silvestres ou amostras biológicas obtidas em unidades de conservação (Instrução Normativa nº 154, de 01 de março de 2007 – Ibama/MMA); ii) CEUA – para trabalhos que incluam animais do filo

chordata (Lei 11794/08 e o Decreto 6899/09); e iii) CGen – (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético) para trabalhos que se utilizem do patrimônio genético da União, tais como uso de plantas medicinais - patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização (Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001).