



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**  
**HUMANA E ANIMAL**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA**  
**EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

**LAÉRCIO FONTINELE BANDEIRA DE MACÊDO**

**BIOPROSPECÇÃO DE CRIOPROTETORES ALTERNATIVOS PARA**  
**CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

**TERESINA – PIAUÍ**

**2021**

LAÉRCIO FONTINELE BANDEIRA DE MACÊDO

BIOPROSPECÇÃO DE CRIOPROTETORES ALTERNATIVOS PARA  
CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde Humana e Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula.

Coorientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

TERESINA – PIAUÍ

2021

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

Macedo, Laercio Fontinele Bandeira de.  
Bioprospecção de crioprotetores alternativos  
para conservação de sêmen caprino [recurso  
eletrônico] / Laercio Fontinele Bandeira de  
Macedo. - 2021.  
131 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, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira  
Paula..

1. Caprino. Sêmen. Crioprotetor. Gema de ovo  
de Numida meleagris.. I. Título.

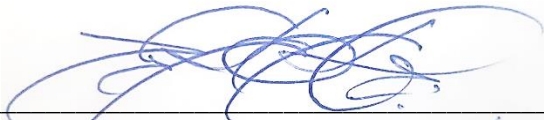
LAÉRCIO FONTINELE BANDEIRA DE MACÊDO

BIOPROSPECÇÃO DE CRIOPROTETORES ALTERNATIVOS PARA  
CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

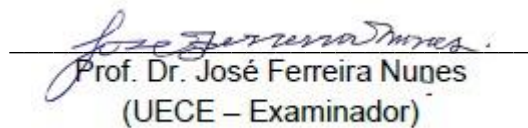
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde Humana e Animal.

Aprovada em: 24 de novembro de 2021.

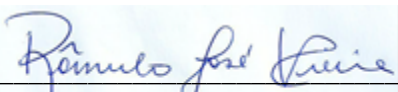
BANCA EXAMINADORA



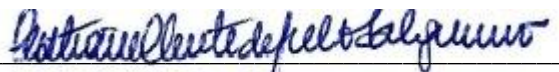
Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula (Orientador)  
Universidade Federal do Piauí - UFPI



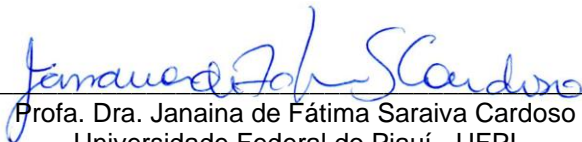
Prof. Dr. José Ferreira Nunes  
(UECE – Examinador)



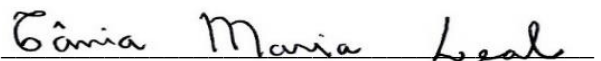
Prof. Dr. Rômulo José Vieira  
Universidade Federal do Piauí - UFPI



Profa. Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro  
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Profa. Dra. Janaina de Fátima Saraiva Cardoso  
Universidade Federal do Piauí - UFPI



Dra. Tania Maria Leal  
EMBRAPA Meio-Norte

Dedico primeiramente a Deus, e às pessoas mais importantes da minha vida, sem as quais não teria chegado a esse momento, são elas: meus pais (Francisco Bandeira de Macêdo e Maria Rozilene Fontinele de Macêdo); minha esposa Nildene Silva Andrade Bandeira; meus filhos Laércio Filho e Maria Valentina; meu irmão Lafayethe; meu orientador Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula; e meu coorientador Dr. José Ferreira Nunes.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sem o qual nada seria possível, minha fonte de força e inspiração, e que tem me permitido oportunidades e graças nesta vida.

Aos meus pais, que sempre valorizaram a educação e que sempre me incentivaram a acreditar nos estudos e nos meus sonhos.

A meu irmão Lafaythe, pelo apoio e por acreditar no meu melhor.

A minha esposa Nildene, companheira, amiga, que sempre esteve do meu lado, que me deu forças, amor, paciência e oportunidade de criar uma família com meus dois filhos (Laércio Filho e Maria Valentina), por toda cumplicidade, cuidados, conselhos, por ser meu porto seguro e minha melhor amiga.

Ao Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula, pela orientação, colaboração, apoio, esforço, confiança e amizade oferecida a minha pessoa e família. Ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes, pela coorientação, confiança, oportunidades de informação do Mestrado e banca de dissertação.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaína de Fátima Saraiva Cardoso, pelo apoio e colaboração nas análises estatísticas e banca de dissertação.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, por ter aceitado participar da banca examinadora do meu trabalho, pela colaboração e confiança.

Ao Prof. Dr. Rômulo José Vieira pelo apoio no aprendizado e fazer parte da banca de dissertação.

Ao Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho pelo apoio em Biotecnologia. Ao Prof. Dr. Fabrício Pires de Moura do Amaral e sua orientanda Larissa Roque, pela atenção no teste COMETA no Laboratório de Mutagenicidade (LABMUT) do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade (NPBio/ UESPI). Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regilda Saraiva dos Reis Moreira Araújo, Coordenadora do LABROMBIOQ-LASA/UFPI e sua orientanda Bruna Barbosa, pelas análises da gema de ovo de *Numida meleagris*.

À Pesquisadora Dra. Tania Maria Leal EMBRAPA Meio-Norte, por fazer parte da banca de dissertação. Aos colegas doutorandos, mestrandos e graduandos do grupo de Pesquisa Sanidade e Reprodução Animal da UFPI, por me ajudarem e sempre estarem à disposição.

A empresa ACP Biotecnologia, por nos doar o diluente ACP-101c<sup>®</sup>. E aos Professores que fazem parte do programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia da Saúde Humana e Animal da UESPI/UECE.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito dos diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101c<sup>®</sup>) e TRIS adicionado em diferentes concentrações da gema de ovo de galinha d'angola (*Numida meleagris*). Foram colhidos 15 ejaculados de cinco caprinos da raça Anglo Nubiana, semanalmente no período de cinco meses, com auxílio de uma vagina artificial. Em cada colheira, os ejaculados com motilidade massal ( $\geq 3$ ), motilidade progressiva ( $\geq 80\%$ ) e vigor ( $\geq 3$ ) foram selecionados. Em seguida, os ejaculados foram reunidos em um *pool* e divididos em 12 grupos e alíquotas iguais de 0,5 mL de sêmen e diluídas nos seguintes Grupos Controles – (GC1 TRIS, com adição 2,5% da gema de ovo de galinha *Gallus gallus domesticus* GOGD), (GC2 Grupo ACP-101c<sup>®</sup>, com adição 2,5% da gema de ovo de galinha *Gallus gallus domesticus* GOGD) e Grupos Experimentais GE, com a adição da gema de ovo de galinha d'Angola (*Numida meleagris*) – (TRIS 2,5%GONM; TRIS 5%GONM; TRIS 10%GOMN; TRIS 15%GOMN; TRIS 20%GONM) e (ACP-101c<sup>®</sup> 2,5%GONM; ACP-101c<sup>®</sup> 5%GOMN; ACP-101c<sup>®</sup>10%GOMN; ACP-101c<sup>®</sup> 15%GOMN; ACP-101c<sup>®</sup> 20% GONM). Posteriormente, foram envasadas em palhetas francesas de 0,25 mL e congeladas com auxílio do aparelho TK3000<sup>®</sup> e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). Após sete dias, as amostras foram descongeladas e avaliadas quanto à cinética espermática utilizando *Computer Assisted Sperm Analyser* (CASA), a integridade de membranas, a morfologia espermática, a análise de fragmentação do DNA espermático pelo teste *OpenComet*, análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise bromatológica da gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM). Foram obtidas as médias e desvios-padrão e procedida à análise de variância (ANOVA) pelo teste PLSD de *Fisher* para os parâmetros espermáticos motilidade, morfologia, análises da viabilidade espermáticas e a cinética espermática (CASA); e pelo teste de *Kruskal-Wallis* para o parâmetro de vigor espermático. Nas análises dos grupos contendo GOMN pelo sistema CASA observou-se que os parâmetros MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR, BCF e ALH obteve-se resultados semelhantes comparados aos grupos contendo GOGD ( $P>0,05$ ). Os parâmetros espermáticos dos grupos contendo GOGD e GONM foram avaliados pós diluição e pós-descongelação e pôde-se observar que a MT e vigor foi mantidas análogas. A integridade de todas membranas e acrossomos avaliados não sofreram influência do tratamento ( $P>0,05$ ) nem do diluente empregado para criopreservação ( $P>0,05$ ). A morfologia espermática foi

igualmente preservada pelas diferentes concentrações de GOGD e GONM nos diluentes de ACP® e TRIS, sem diferenças significativas estatísticas ( $P>0,05$ ). No teste *OpenComet*, foi possível observar uma boa viabilidade espermática da GOGD 2,5%, GONM 2,5%, GONM 5% nos grupos TRIS e ACP®. Já na avaliação da porcentagem de fragmentação de DNA espermático não houveram diferenças significativas ( $P>0,05$ ). Na avaliação por MET não houve ações danosas nas cabeças dos espermatozoides, com membranas íntegras e acrossoma totalmente preservado nos grupos GONM e GOGD. Na análise da GONM verificou-se valores de proteína bruta de 9,37%, pH de 6,99 e lipídeos de 34,56%. A GONM pode ser utilizada como substituto da GOGD proporcionando uma ação protetora das membranas espermáticas, mantendo os parâmetros espermáticos e protegendo o DNA espermático.

**Palavras-chave:** Caprino. Sêmen. Crioprotetor. Gema de ovo de *Numida meleagris*.



## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of extenders based on powdered coconut water (ACP-101c®) and TRIS added at different concentrations of guinea hen egg yolk (*Numida meleagris*). Fifteen ejaculates were collected from five Anglo Nubian goats, weekly over a period of five months, with the aid of an artificial vagina. In each harvest, ejaculates with mass motility ( $\geq 3$ ), progressive motility ( $\geq 80\%$ ) and vigor ( $\geq 3$ ) were selected. Then, the ejaculates were collected in a pool and divided into 12 groups and equal aliquots of 0.5 mL of semen and diluted in the following Control Groups - (GC1 TRIS, with 2.5% addition of the egg yolk of *Gallus gallus domesticus* GOGD), (GC2 Group ACP-101c®, with 2.5% addition of hen's egg yolk *Gallus gallus domesticus* GOGD) and Experimental Groups GE, with addition of hen's egg yolk (*Numida meleagris*) – (TRIS 2.5%GONM; TRIS 5%GONM; TRIS 10%GOMN; TRIS 15% GOMN; TRIS 20%GONM) and (ACP-101c® 2.5%GONM; ACP-101c® 5%GOMN; ACP -101c®10%GOMN; ACP-101c® 15%GOMN; ACP-101c® 20% GONM). Subsequently, they were packaged in 0.25 mL French straws and frozen with the aid of the TK3000® device and stored in liquid nitrogen (-196°C). After seven days, the samples were thawed and evaluated for sperm kinetics using Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA), membrane integrity, sperm morphology, sperm DNA fragmentation analysis by the OpenComet test, ultrastructural analysis by transmission electron microscopy (MET) and bromatological analysis of the egg yolk of *Numida meleagris* (GONM). Means and standard deviations were obtained and analysis of variance (ANOVA) was performed using Fisher's PLSD test for sperm parameters motility, morphology, sperm viability analysis and sperm kinetics (CASA); and by the Kruskal-Wallis test for the parameter of spermatic vigor. In the analyzes of the groups containing GOMN by the CASA system, it was observed that the parameters MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR, BCF and ALH obtained similar results compared to the groups containing GOGD ( $P>0.05$ ). The sperm parameters of the groups containing GOGD and GONM were evaluated post-dilution and post-thawing and it could be observed that the MT and vigor were kept similar. The integrity of all membranes and acrosomes evaluated was not influenced by the treatment ( $P>0.05$ ) or the diluent used for cryopreservation ( $P>0.05$ ). Sperm morphology was equally preserved by the different concentrations of GOGD and GONM in ACP® and TRIS extenders, with no statistically significant differences ( $P>0.05$ ). In the OpenComet test, it was possible to observe a

good sperm viability of GOGD 2.5%, GONM 2.5%, GONM 5% in the TRIS and ACP® groups. In the evaluation of the percentage of spermatic DNA fragmentation, there were no significant differences ( $P>0.05$ ). In the evaluation by MET there were no harmful actions on the sperm heads, with intact membranes and a totally preserved acrosome in the GONM and GOGD groups. The GONM analysis showed crude protein values of 9.37%, pH of 6.99 and lipids of 34.56%. GONM can be used as a substitute for GOGD providing a protective action of sperm membranes, maintaining sperm parameters and protecting sperm DNA.

**Keywords:** Caprine. Semen. Cryoprotectant. *Numida meleagris* egg yolk.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação gráfica da análise de velocidades e amplitude de deslocamento lateral da cabeça por meio do software *Sperm Class Analyzer* (SCA<sup>®</sup>, Microoptics, S.L., Barcelona, Espanha)..... 44

### CAPÍTULO I

- Figura 1 – Percentuais do parâmetro espermático (motilidade), análise subjetiva pós-diluição e pós-descongelção de sêmen caprino em diferentes diluentes (TRIS e ACP-101c<sup>®</sup>) em diferentes concentrações da gema de ovo das espécies *Gallus gallus domesticus* (GOGD) e *Numida meleagris* (GONM)..... 75

### CAPITULO II

- Figura 1 – Registro do comprimento da cauda do DNA de espermatozoides caprinos criopreservado em TRIS adicionado de diferentes concentrações da gema de ovo de *Numida meleagris* pós-descongelção através da análise do “OpenComet”. (\*) comparado com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). T = TRIS; GC = Grupo Controle; Dias da coleta (22/08; 28/09; 24/10; 30/11; 07/12); % das amostras dos grupos experimentais (2,5%; 5%; 10%; 15%; 20%)..... 86
- Figura 2 – Registro da porcentagem de DNA na cauda de espermatozoides após análise do “OpenComet” de espermatozoides caprinos criopreservado em TRIS adicionado de diferentes concentrações da gema de ovo de *Numida meleagris* pós-descongelção através da análise do “OpenComet”. (\*) comparado com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). T = TRIS; GC = Grupo Controle; Dias da coleta (22/08; 28/09; 24/10; 30/11; 07/12); % das amostras dos grupos experimentais (2,5%; 5%; 10%; 15%; 20%)..... 87

- Figura 3 – Registro do comprimento da cauda do DNA de espermatozoides caprinos criopreservado em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações da gema de ovo de *Numida meleagris* pós-descongelamento através da análise do “OpenComet”. (\*) comparado com o grupo controle (P < 0,05). A = ACP-101c<sup>®</sup>; GC = Grupo Controle; Dias da coleta (22/08;28/09;24/10;30/11;07/12); % das amostras dos grupos experimentais (2,5%;5%;10%;15%;20%)..... 88**
- Figura 4 – Registro da porcentagem de DNA na cauda de espermatozoides após análise do “OpenComet” de espermatozoides caprinos criopreservado em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações da gema de ovo de *Numida meleagris* pós-descongelamento. (\*) comparado com o grupo controle (P < 0,05). A = ACP-101c<sup>®</sup>; GC = Grupo Controle; Dias da coleta (22/08; 28/09; 24/10; 30/11; 07/12); % das amostras dos grupos experimentais (2,5%; 5%; 10%; 15%; 20%)..... 89**
- Figura 5 – Análise ultraestrutural de espermatozoides após descongelamento, os quais foram criopreservados em meio ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 2,5% de gema de ovo de *Gallus gallus domesticus* (grupo controle), por meio de microscopia eletrônica de transmissão..... 90**
- Figura 6 – Análise ultraestrutural de espermatozoides caprinos após descongelamento, os quais foram criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 2,5% da gema de ovo de *Gallus gallus domesticus* (grupo controle), através de microscopia eletrônica de transmissão..... 90**
- Figura 7 – Análise ultraestrutural de espermatozoides após descongelamento, os quais foram criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 10% da gema de ovo de *Numida meleagris*, por meio de microscopia eletrônica de transmissão 91**
- Figura 8 – Análise ultraestrutural de espermatozoides caprinos após descongelamento, os quais foram criopreservados em ACP-**

	<b>101c<sup>®</sup> adicionado de 2,5% da gema de ovo de <i>Numida meleagris</i>, através de microscopia eletrônica de transmissão.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 9 –</b>	<b>Análise ultraestrutural de espermatozoides caprinos após descongelação, os quais foram criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 2,5% da gema de ovo de <i>Gallus gallus domesticus</i> (grupo controle), através de microscopia eletrônica de transmissão.....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comparação do valor nutricional do ovo (gema e clara) das espécies <i>Gallus gallus domesticus</i> , <i>Gallus gallus hibrido</i> e <i>Numida meleagris</i> .....	38
Quadro 2 – Composição de minerais da gema de ovo das espécies <i>Gallus gallus domesticus</i> , <i>Gallus gallus hibrido</i> e <i>Numida meleagris</i> ...	39
Quadro 3 – Características desejáveis do ejaculado de caprinos colhidos por vagina artificial.....	42
Quadro 4 – Características desejáveis para a dose de espermatozoides refrigerados.....	42
Quadro 5 – Características desejáveis para dose de espermatozoides congelados.....	43
Quadro 6 – Parâmetros informativos de motilidade espermática obtidos através do software <i>Sperm Class Analyzer (SCA®</i> , Microptics, S.L., Barcelona, Espanha).....	44

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

Tabela 1 – Composição química da gema de ovo de galinha d'Angola ( <i>Numida meleagris</i> ).....	69
Tabela 2 – Médias ( $\pm$ d.p.) do parâmetro espermático (vigor) pós-diluição e pós-descongelamento do sêmen caprino em diferentes diluentes (TRIS e ACP-101c <sup>®</sup> ) e em diferentes concentrações de gema de ovo das espécies <i>Gallus gallus domesticus</i> (GOGD) e <i>Numida meleagris</i> (GONM).....	70
Tabela 3 – Médias ( $\pm$ d.p.) dos parâmetros de cinética espermática (MT, VCL, VSL e VAP) do sêmen caprino criopreservado em ACP-101c <sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo de <i>Numida meleagris</i> avaliados pelo CASA pós-descongelamento.....	71
Tabela 4 – Médias ( $\pm$ d.p.) dos parâmetros da cinética espermática (MT, VCL, VSL e VAP) do sêmen caprino criopreservado em TRIS adicionado de diferentes concentrações de GONM avaliados pelo CASA pós-descongelamento.....	71
Tabela 5 – Médias ( $\pm$ d.p.) dos parâmetros da cinética espermática (LIN, STR e OSC) no sêmen caprino criopreservado em ACP-101c <sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações de GONM avaliados pelo CASA pós-descongelamento.....	72
Tabela 6 – Médias ( $\pm$ d.p.) dos parâmetros da cinética espermática (LIN, STR e OSC) no sêmen caprino criopreservado em TRIS adicionado de diferentes concentrações de GONM avaliados pelo CASA pós-descongelamento.....	72
Tabela 7 – Médias ( $\pm$ d.p.) da integridade de membrana plasmática, atividade mitocondrial e integridade de acrossoma do sêmen caprino criopreservado em ACP-101c <sup>®</sup> e TRIS adicionado de diferentes concentrações de GONM avaliados por coloração fluorescente pós-descongelamento..	73

<b>Tabela 8 – Médias (<math>\pm</math> desvio padrão) da morfologia de espermatozoides caprinos criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações de GONM avaliados pós-descongelção.....</b>	<b>74</b>
--	-----------

## **CAPITULO II**

<b>Tabela 1 – Descrição dos grupos controles.....</b>	<b>83</b>
<b>Tabela 2 – Descrição dos Grupos Experimentais.....</b>	<b>83</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Água de coco em pó
ACP-101c <sup>®</sup>	Meio de criopreservação para sêmen caprino à base de água de coco em pó
AI	Acrossomas íntegros
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
AOAC	Associação Oficial de Química Analítica
BCF	Frequência do batimento cruzado
Ca <sup>+2</sup>	Íon cálcio
CASA	<i>Computer-assisted Sperm Analyser</i> (Análise de Sêmen Auxiliada por Computador)
CCS	Centro de Ciências da Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
EYCE	Enzima coaguladora da gema-de-ovo de galinha
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FAVET	Faculdade de Veterinária
GE	Grupos experimentais TRIS e ACP-101c <sup>®</sup> com GONM
GC1	Grupo controle Hidroximetil aminometano com 2,5% GOGD
GC2	Grupo controle ACP-101c <sup>®</sup> com 2,5% de GOGD
GOGD	Gema de ovo de galinha doméstica ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )
GOGH	Gema de ovo de <i>Gallus gallus hibrido</i>
GONM	Gema de ovo de galinha d'Angola ( <i>Numida meleagris</i> )
IA	Inseminação artificial
IAA	Ácido 3-indol acético
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP	Iodeto de propídio
LABMUT	Laboratório de Mutagenicidade
LASA	Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Análise Sensorial de Alimentos
LBROMBIOQ	Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade

LIN	Linearidade
LTSCO	Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MOTE	Múltiplas ovulações e transferência de embriões
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
NPBio	Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade
P.O.	Puros de origem
pH	Potencial hidrogeniônico
PIV	produção <i>in vitro</i> de embriões
SBUIII	Enzima proveniente das glândulas bulbouretrais
SCA	<i>Sperm Class Analyser</i>
STR	Índice de oscilação ou retilinearidade
TE	Transferência de embriões
Tris	Hidroximetil aminometano
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UESPI	Universidade Estadual do Piauí
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UnB	Universidade de Brasília
VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilinear
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VSL	Velocidade linear

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Sistema Reprodutor do Macho Caprino.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Diluentes para o Sêmen Caprino.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Crioprotetores Seminais.....</b>	<b>27</b>
2.3.1	Crioprotetores não-penetrantes (extracelulares).....	28
2.3.2	Crioprotetores penetrantes (intracelulares).....	30
<b>2.4</b>	<b>Água de Coco na Reprodução.....</b>	<b>32</b>
<b>2.5</b>	<b>Composição Química Específica da Gema do ovo de Galinha Doméstica (<i>Gallus Gallus Domesticus</i>; GOGD) e da Gema do ovo de Galinha D'angola (<i>Numida Meleagris</i>; GONM).....</b>	<b>35</b>
<b>2.6</b>	<b>Crioinjúrias Celulares.....</b>	<b>40</b>
<b>2.7</b>	<b>Avaliação da Viabilidade Espermática “In Vitro” Pós-Descongelação.....</b>	<b>42</b>
2.7.1	Padrões do sêmen caprino segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).....	42
2.7.2	Cinéticaespermática.....	43
2.7.3	Morfologiaespermática.....	45
2.7.4	Microscopia de fluorescência.....	46
2.7.5	Teste hiposmótico.....	46
2.7.6	Método Cometa.....	47
2.7.7	Avaliação ultraestrutural.....	48
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>CAPITULO I - Assessment of coconut water added to <i>Numida meleagris</i> egg yolk as cryoprotectant for goat semen.....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>CAPITULO II – Avaliação da viabilidade espermática de sêmen caprino criopreservado em meio ACP-101c e TRIS acrescido de gema de ovo de <i>Numida meleagris</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>96</b>

<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>97</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS.....</b>	<b>129</b>
	<b>ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO I.....</b>	<b>130</b>
	<b>ANEXO C – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO II .....</b>	<b>131</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O rebanho mundial de caprino é composto por 1,03 bilhões de animais (FAO, 2017). Segundo dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Estado do Piauí, pelo terceiro ano consecutivo, registra crescimento do efetivo número de caprinos, de 1.811.964 para 1.874.530 entre os anos de 2018 e 2019, o que significa uma alta de 11% ou 63 mil cabeças/ano (IBGE, 2019).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE o rebanho caprinos cresceu 4% no Brasil em 2020, para 12,1 milhões de cabeça, sendo 10,7 milhões na região nordeste. O estado da Bahia possuía 30% do rebanho brasileiro, sendo o maior produtor de caprino no Brasil, o estado de Pernambuco com 22% do rebanho constituindo o segundo maior produtor caprino e o estado do Piauí com um equivalente de 17% do rebanho no Brasil, o que coloca o Estado na terceira posição entre todas as Unidades da Federação (IBGE, 2020).

O sêmen caprino é extremamente sensível ao choque térmico e às variações de pH e pressão osmótica da solução diluente (DEKA; RAO, 1985). Para que os espermatozoides ejaculados sobrevivam por longos períodos, é necessária a adição de agentes protetores ao sêmen que proporcionem nutrientes como fonte de energia, o tamponamento do pH, a pressão osmótica adequada, o equilíbrio eletrolítico e o aumento do volume do ejaculado visando aumentar o número de doses seminais para a inseminação artificial (IA) (AISEN, 2008).

Diante dessa problemática, a utilização de biotécnicas da reprodução, como a criopreservação seminal, a inseminação artificial (IA), a transferência de embrião (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIV), torna-se necessária a fim de intensificar o aumento do rebanho, além da possibilidade de uso de animais geneticamente superiores (QIN *et al.*, 2018).

Diversos meios para criopreservação do sêmen caprino são constituídos: à base de citrato de sódio, gema de ovo, lactose, água de coco, Tris (hidroximetil aminometano), crioprotetor interno ou penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfóxido), sais (citrato de sódio ou ácido cítrico) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina) (PURDY, 2006).

Por ser uma solução estéril, ligeiramente ácida, composta de 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 sobrevivência e viabilidade dos gametas masculinos e femininos criopreservados (CARVALHO *et al.*, 2006). Diluentes à base de água de coco *in natura* têm apresentado resultados satisfatórios quando utilizados para a conservação de espermatozoides de espécies como caninos (CARDOSO *et al.*, 2003), ovinos (MACHADO *et al.*, 2006) e caprinos (SALGUEIRO *et al.*, 2002).

A partir de 2002 foi produzida a água de coco na forma de pó (ACP®) (SALGUEIRO; GONDIM; NUNES, 2002) e vários meios de conservação espermáticos foram elaborados e testados para diversas espécies de mamíferos (NUNES; SALGUEIRO, 2006) e aves (RONDON *et al.*, 2008).

A gema de ovo de galinha (*Gallus gallus domesticus*) é o ingrediente mais usual em diluentes de sêmen de mamíferos para preservar os espermatozoides contra crioinjúrias durante o processo de congelação-descongelação (FOROUSANFAR *et al.*, 2010).

Um diluente proposto para a criopreservação seminal deve suprir os espermatozoides com uma fonte de energia, proteção contra crioinjúrias e a manutenção de um ambiente adequado à sobrevivência espermática (PURDY, 2006). Nesse sentido, a utilização de um meio à base de água de coco em pó (ACP-101c®) associado à gema do ovo da galinha d'angola (*Numida meleagris*) poderá apresentar resultados satisfatórios, tornando-se mais uma opção para o avanço da reprodução animal.

Com base em estudos realizados, tem-se verificado ampla utilização com resultados significativos da gema de ovo de galinha como diluente e crioprotetor seminal de mamíferos, obtendo resultados positivos tanto na refrigeração quanto na congelação. Observa-se que este diluente, quando adicionado no sêmen de caprinos, apresenta substâncias que reduzem o choque térmico, possivelmente pela ação protetora das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que se ligam firmemente aos espermatozoides (BARROS; TONIOLLI, 2011).

Meios diluentes à base de ACP® têm demonstrado viabilidade na criopreservação seminal caprino (SALGUEIRO *et al.*, 2003). Entretanto, conforme outros experimentos, a eficiência deste para a criopreservação do sêmen caprino ainda necessita de avaliações comparando com outros diluentes.

Nesse sentido, a utilização do meio de criopreservação de sêmen caprino à base de água de coco em pó (ACP-101c®) adicionado gema de ovo da galinha d'angola como crioprotetor externo poderá apresentar resultados satisfatórios, tornando-se mais uma opção para o avanço da reprodução animal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Sistema Reprodutivo do Macho Caprino

O sistema reprodutivo do macho caprino é composto por órgãos que, de forma conjunta, atuam na produção de espermatozoides para posterior deposição no trato reprodutivo da fêmea. Nesse contexto, fazem parte do sistema reprodutivo masculino: dois testículos, dois epidídimos, dois ductos deferentes, duas ampolas do ducto deferente, glândulas reprodutivas acessórias (próstata, bulbouretrais e vesiculares), um pênis e um prepúcio (KONIG; LIEBICH, 2016).

Os testículos situam-se um paralelo ao outro, de forma pendular em um divertículo do abdômen denominado escroto, possuindo por sua vez, funções endócrinas e exócrinas, ou seja, produção de hormônios e produção de espermatozoides, respectivamente (DYCE; SACK; WENSING, 2004; SACK; WENSING, 2004).

O escroto é formado por seis túnicas, caracterizando uma dobra cutânea. São elas: pele ou escroto, dartos, túnica celulosa, cremáster, túnica fibrosa e túnica vaginal (GONÇALVES *et al.*, 2008). Além do escroto, os testículos estão envoltos por uma cápsula espessa, constituída por tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea. Septos de tecidos da túnica albugínea se estendem para o interior dos testículos formando os lóbulos, uma vez que nos ruminantes estes septos são mais finos (BACHA JR.; BACHA, 2003).

Os túbulos seminíferos retorcidos situam-se dentro de cada lóbulo testicular, sendo revestidos por um epitélio estratificado composto por células espermatogênicas e células de Sertoli. Já o tecido intersticial localizado entre os túbulos seminíferos comporta as células de Leydig (BACHA JR.; BACHA, 2003).

As células de sustentação ou de Sertoli são células que compõem o epitélio seminífero, estendendo-se da lâmina basal para o lúmen dos túbulos seminíferos. São responsáveis por formarem junções intercelulares (zonas de oclusão), e devido a essas junções, o conteúdo presente nos vasos sanguíneos, logo abaixo da lâmina basal, não pode comunicar-se com os componentes do lúmen dos túbulos seminíferos. Esse mecanismo é denominado barreira hemato-testicular (SAMUELSON, 2007). As células de Sertoli são menos numerosas comparadas às



células espermatogênicas. Possuem núcleo oval ou triangular pálido e nucléolo proeminente (BACHA JR.; BACHA, 2003).

As células intersticiais ou de Leydig estão presentes nos espaços entre os túbulos seminíferos, sendo responsáveis por sintetizar e secretar testosterona, hormônio responsável pelas características masculinas. Estas células possuem como características núcleos pequenos e redondos, além de citoplasma acidófilo (BACHA JR.; BACHA, 2003).

Os espermatozoides produzidos nos túbulos seminíferos alcançam os túbulos retos e progridem para a rede do testículo, ductos eferentes e epidídimo (SAMUELSON, 2007).

O epidídimo é um órgão constituído por um ducto enovelado e longo, com tamanho variado de acordo com as diferentes espécies (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Este é dividido em cabeça, corpo e cauda (KONIG; LIEBICH, 2016).

A cabeça do epidídimo possui formato plano, sendo unida à parte superior do testículo no seu polo dorsal. O corpo do epidídimo é a porção mais estreita, unindo a cabeça à cauda. Já no polo ventral, situa-se a cauda do epidídimo (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Aproximadamente 25% a 70% dos espermatozoides produzidos diariamente podem ser armazenados pela cauda do epidídimo (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). As condições necessárias para a maturação, desenvolvimento da motilidade e armazenamento de espermatozoides é concedida pelo epidídimo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O ducto deferente, corresponde à continuação do sistema de ductos da cauda do epidídimo para a uretra pélvica. Ao deixar o testículo em direção ao abdômen é circundado por vasos linfáticos, artéria, veia e nervos testiculares (REECE, 2014). As glândulas acessórias produzem secreções que cooperam para a formação do plasma seminal, sendo este o meio pelo qual os espermatozoides utilizam para nutrir-se, além de atuar como veículo espermático (KONIG; LIEBICH, 2016).

As glândulas vesiculares são encontradas em pares, possuindo formato lobulado. A frutose é o seu principal componente, atuando no suprimento energético dos espermatozoides (KONIG; LIEBICH, 2016). O seu conteúdo atua também como substância tamponante, impedindo desta forma, alterações de pH no ambiente em que os espermatozoides estão. A anti-aglutinina é uma proteína produzida pela próstata. Sua principal função é prevenir a aglutinação dos espermatozoides, fazendo com que estes se movimentem livremente.

As glândulas bulbouretrais são incumbidas pela produção de mucina, que proporciona um aspecto gelatinoso ao sêmen, além de proteger os espermatozoides (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O óstio interno do colo da bexiga e o óstio externo da uretra, na extremidade do pênis, delimitam a uretra masculina (DYCE; SACK; WENSING, 2004). O órgão copulador do macho é o pênis, estrutura pela qual passam espermatozoides e urina. O tecido cavernoso ou tecido erétil é a principal estrutura que ocupa o pênis internamente. No bode, há uma flexura sigmoide, que quando está em repouso forma um S, conhecido como S peniano. A extensão da flexura sigmoide ocorre no momento da cópula. O prepúcio corresponde a uma prega de pele responsável por envolver a extremidade livre do pênis (KONIG; LIEBICH, 2016).

## **2.2 Diluentes para o Sêmen Caprino**

As principais finalidades dos diluentes seminais são: fornecer energia aos espermatozoides; protege-los durante a manipulação nas variações de temperatura; manter o pH adequado; inibir o crescimento bacteriano e, associado à taxas lentas de decréscimo de temperatura, possibilitar que as células percam água por osmose, inibindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares, fornecendo assim, condições favoráveis para que as células permaneçam com qualidade e viabilidade após o processo de congelação e descongelação (SILVA; GUERRA, 2011; WATSON, 2000).

Um bom diluente se caracteriza pela ausência de toxicidade à célula espermática, pela osmolaridade adequada, poder nutritivo e tampão eficaz, pelos estabilizadores de membrana, pelo pH, que favorece a sobrevivência espermática e por último, por ser de fácil preparo e baixo custo (CONCANNON; BATISTA, 1989; PURDY, 2006).

A capacidade tampão de um diluente tem grande importância para o sêmen de bodes, uma vez que, devido a sua alta concentração espermática, apresenta uma ação frutolítica intensa. Como consequência desse processo metabólico, há um acúmulo de ácido láctico e carbônico, que causa a morte dos espermatozoides, motivo necessário manter o pH entre 6,2 e 6,8. A necessidade de adicionar eletrólitos aos meios diluentes decorre do fato de que sua ausência total provoca a perda de características vitais aos espermatozoides, em virtude de fenômenos endosmóticos.

A pressão osmótica dos diluentes, para o sêmen de bode, deve oscilar entre 300 e 330 mOsm/L H<sub>2</sub>O (NUNES; SALGUEIRO; SOUSA, 2019).

Para aprimorar os meios utilizados para diluição seminal, substâncias antioxidantes (MEMOM *et al.*, 2012; PENITENTE-FILHO *et al.*, 2014; SHAFIEI *et al.*, 2015), carboidratos (NAING *et al.*, 2010; QUAN *et al.*, 2012), crioprotetores (BÜYÜKLEBLEBICI *et al.*, 2014; FARSHAD; KHALILI; FAZELI, 2009; KULAKSIZ *et al.*, 2013), entre outros componentes, têm sido alvos de diversos estudos.

Segundo Gibbons (2002), é imprescindível na composição de um diluente usado para a congelação do sêmen caprino uma substância tampão como o Tris, sais como o citrato de sódio, um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose ou trealose), crioprotetores penetrantes (glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfóxido) e não-penetrantes (leite ou gema de ovo) além de antibióticos, sendo a penicilina e a estreptomicina os mais utilizados. Um dos diluentes mais utilizados para sêmen caprino é composto por diversas substâncias, tais como: Tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo e glicerol (NEVES *et al.*, 2008). O Tris é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Ele permanece estável em temperatura ambiente por diversos meses, atuando como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (MCPHAIL; GOODMAN, 1984).

Para sêmen caprino, entre os meios mais estudados e utilizados no processo de criopreservação estão: Tris-gema de ovo de galinha (BISPO *et al.*, 2011; MATOS-BRITO *et al.*, 2013), Citrato-gema de ovo de galinha (BISPO *et al.*, 2011; MATOS-BRITO *et al.*, 2013), diluentes à base de leite desnatado (DORADO *et al.*, 2010; KÜÇÜK *et al.*, 2014), à base de soja, como a versão comercial Bioxcell® (PENITENTE-FILHO *et al.*, 2014; ROOF *et al.*, 2012); à base de água de coco, comercialmente vendido como o ACP-101® (OLIVEIRA *et al.*, 2011), entre outros. Contudo, segundo Maia (2014), as taxas de concepção obtidas utilizando sêmen caprino criopreservado, ainda não são satisfatórias. Com isso, muitas pesquisas continuam sendo desenvolvidas para aperfeiçoar os diluentes e assim melhorar a qualidade e viabilidade seminal pós-descongelação (ANSARI *et al.*, 2012; NAING *et al.*, 2010).

De acordo com Purdy (2006), além do Tris, diluentes à base de leite em pó desnatado também são muito utilizados; entretanto, o primeiro confere os melhores resultados de motilidade após a descongelação (DEKA; RAO, 1985). Isso porque o sêmen caprino apresenta particularidades que limitam o uso exacerbado de diluentes

ricos em fosfolipídios, como aqueles à base de leite ou mesmo com altas proporções da gema de ovo de galinha. Tal fato se deve a certos componentes do plasma seminal específicos desta espécie e produzidos principalmente na contra estação sexual (NEVES *et al.*, 2008). Esses componentes foram primariamente definidos como EYCE (enzima coaguladora da gema de ovo de galinha; ROY *et al.*, 1957) e SBUIII (proveniente da glândula bulbouretral e que causava decréscimo da sobrevivência espermática quando se usava diluentes a base de leite; NUNES *et al.*, 1982). Entretanto, estudos mais recentes identificaram essas duas enzimas como sendo a mesma molécula (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000). Trata-se da fosfolipase “A”, uma glicoproteína lipase produzida na glândula bulbouretral dos caprinos que hidrolisa fosfolipídios presentes nos diluentes, formando lisolecitinas e ácidos graxos, substâncias tóxicas aos espermatozoides (PURDY, 2006). Diante deste problema, buscou-se um meio diluente pobre em fosfolipídios, sendo então desenvolvida a água de coco em pó (ACP®) como uma alternativa viável para a diluição do sêmen caprino (SALGUEIRO; GONDIM; NUNES, 2002).

### 2.3 Crioprotetores Seminais

O aperfeiçoamento da criopreservação seminal tem evoluído progressivamente desde a descoberta do potencial crioprotetor do glicerol. Esta técnica é de suma importância para as demais biotecnologias da reprodução, pois permite que o sêmen coletado seja armazenado à baixas temperaturas e utilizado posteriormente para diversos fins, como na IA, múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE) e no processo de produção *in vitro* de embriões (PIV) (KONYALI *et al.*, 2013; MAIA, 2014).

As soluções utilizadas como diluidores do sêmen diferem em eficiência, em quantidade e na qualidade dos componentes. Porém, todos possuem a finalidade de preservação dos espermatozoides por meio da nutrição, proteção de sua membrana plasmática e equilíbrio osmótico (DIAS, 2010).

De acordo com a função, o crioprotetor pode interagir com a membrana celular, proporcionando sua estabilização, evitando lesões (DIAS, 2010). Outras substâncias podem atuar na diminuição da produção de cristais de gelo intracelular que são formados pela congelação da água livre intracelular, estes cristais podem perfurar a membrana da célula espermática promovendo a morte do espermatozoide.

Os valores de motilidade e vigor dos espermatozoides em relação ao tempo de exposição aos diluidores são alguns dos parâmetros que podem demonstrar a eficiência destas soluções. Desconsiderando as vias inerentes às fêmeas, pode-se esperar que as células com pouca movimentação e/ou, pouca velocidade e com alteração na membrana plasmática possuam baixa capacidade de encontrar e fecundar um oócito *in vivo*, características que podem ser melhoradas com o uso de um diluente mais eficiente para determinada espécie (DIAS, 2010).

### 2.3.1 Crioprotetores não-penetrantes (extracelulares)

Um crioprotetor externo age no meio extracelular, assim sendo, ele pode agir como um soluto, reduzindo a temperatura de congelação do meio (BEZERRA, 2010). A gema de ovo (*Gallus gallus domesticus*) é usada largamente como crioprotetor externo (RIBEIRO; LARA; BAIÃO, 2007).

Os crioprotetores classificados como não-penetrantes são macromoléculas com ação crioprotetora que se dispõem entre a membrana plasmática e os fluidos hiperosmóticos durante a congelação (HOLT; HEAD; NORTH, 1992; SILVA, 2010), constituindo sua crioproteção efetiva, mesmo quando são utilizadas em elevadas velocidades de congelação, o que leva à promoção de uma rápida desidratação celular (ÁVILA-PORTILLO *et al.*, 2006). Os crioprotetores não-penetrantes de maior utilização são a gema de ovo de galinha e o leite desnatado, embora outros agentes também possam ser utilizados com a mesma finalidade, como é o caso de alguns aminoácidos e açúcares (PURDY, 2006).

Yodmingkwan *et al.* (2016), avaliaram o sêmen caprino refrigerado e congelado utilizando 2,5% da gema de ovo de galinha, e obtiveram resultados indicando que, nessa concentração, a gema de ovo foi suficiente para atingir taxas satisfatórias de motilidade no sêmen pós-descongelação.

O leite é um líquido orgânico que possui certa capacidade tampão, viscosidade adequada para manutenção dos espermatozoides no meio líquido, e abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozoides na produção de energia (CASTELO, 2008; FROTA, 2008; SILVA, 2008). Sabe-se que duas substâncias responsáveis por esta característica são: a lactose, que age como elemento energético, e a caseína que é uma substância capaz de potencializar a atividade cinética dos espermatozoides (CUNHA, 2002).

Bergeron *et al.* (2007), concluíram que as caseínas do leite reduzem a ligação das proteínas do plasma aos espermatozoides, minimizando a perda de lipídeos da membrana plasmática durante os procedimentos de criopreservação e aumentando a proteção espermática durante a refrigeração e a congelação-descongelação. Ademais, produz um efeito protetor do leite sobre a célula espermática envolvendo proteínas ao invés de lipídios como ocorre com os diluentes com gema de ovo de galinha. Purdy (2006) ressaltou que a escolha do açúcar incluído no crioprotetor deve ser baseada na sua funcionalidade e nas propriedades químicas. Dentre os açúcares utilizados nos meios diluentes estão os açúcares simples, como a frutose e a glicose, e os açúcares não-penetrantes na célula, como lactose, rafinose e trealose (GRAHAM, 1996).

A ação dos açúcares não-penetrantes consiste em elevar a pressão osmótica, resultando na desidratação celular, com conseqüente redução da formação de gelo intracelular. Os açúcares podem interagir com os fosfolipídios da membrana plasmática, reorganizando-a e, a partir disto, aumentando a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação (BUCAK *et al.*, 2007).

A gema de ovo de *Gallus gallus domesticus* (GOGD) é um dos constituintes mais utilizados como base dos diluentes de sêmen dos animais domésticos. Ela protege o espermatozoide contra o choque térmico, devido à presença das frações LDLs na sua composição, preservando o espermatozoide. Essa proteção se deve à presença de fosfolipídios, que agem na superfície celular, restaurando a perda de fosfolipídios que ocorre durante o choque térmico e prevenindo, conseqüentemente, a ruptura da membrana celular (BISPO, 2009).

A prevenção conferida pelos lipídios com relação ao choque térmico está relacionada com a retirada do íon  $\text{Ca}^{+2}$  do meio, evitando sua entrada no espermatozoide. É possível que os lipossomas interajam com o  $\text{Ca}^{+2}$  e outros componentes do meio de congelação que afetem a tonicidade ou a fração da água não congelada durante a criopreservação (GRAHAM; SQUIRES, 1996; WILHEM; GRAHAM; SQUIRES, 2006).

Valente *et al.* (2010), avaliaram a substituição parcial ou total da GOGD no diluente de sêmen e observaram que a adição de trealose e glicina, associada à substituição da glicose pela frutose, não foi capaz de compensar a ausência da GOGD. Estes autores avaliaram que os melhores resultados de motilidade,

termorresistência, fertilidade *in vitro* e *in vivo* pós-descongelamento foram obtidos após utilização da GOGD no meio diluente.

Bispo (2009) avaliou diferentes porcentagens da GOGD (20% e 2,5%) no diluente citrato-gema e constatou que aquele com baixa concentração de gema (2,5%) proporcionou melhores resultados em relação ao com alta concentração (20%) referentes ao sêmen caprino refrigerado.

A composição da gema do ovo de galinha é bastante variável, uma vez que é um composto de origem animal e que pode ter diferentes composições de acordo com as práticas de manejo alimentar utilizadas na criação das aves (BRAGA *et al.*, 2005; RIBEIRO; LARA; BAIÃO, 2007). Segundo Barreto *et al.* (2006), a GOGD apresenta a seguinte composição: 49,0% de umidade e 51,0% de sólidos totais; sendo que, destes, 30,9% são lipídios totais. Todavia, a gema de ovo de galinha não é inteiramente definida, sendo um composto biológico que contém proteínas, vitaminas, fosfolipídios, glicose, componentes bactericidas e antioxidantes (HOUPALATHI *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Crioprotetores penetrantes (intracelulares)

Um crioprotetor intracelular tem a capacidade de penetrar na célula espermática através de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma. Isso faz com que o meio fique hipertônico, o que promove a desidratação da célula, prevenindo a formação de cristais de gelo dentro da célula (PURDY, 2006).

No caso do espermatozoide, promovem sua desidratação devido ao fluxo de água osmoticamente direcionado (BEZERRA, 2010). Muitos crioprotetores penetrantes (glicerol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, etilenoglicol, propilenoglicol) e suas combinações têm sido testadas; todavia, o crioprotetor penetrante mais frequentemente utilizado para espermatozoides continua sendo o glicerol, apresentando os melhores resultados (BEZERRA, 2009). O glicerol é um composto orgânico, pertencente a função álcool, líquido na temperatura ambiente, inodoro, incolor, viscoso, com massa molecular de 92 g/mol (FERNANDES *et al.*, 2002).

A adição de glicerol pode ser feita em dois momentos: na diluição inicial, quando o sêmen ainda está em temperatura ambiente, ou após a refrigeração do sêmen a 4 °C, com o intuito de reduzir o efeito tóxico do mesmo (SILVA; GUERRA, 2011).

Os crioprotetores penetrantes são substâncias que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que a congelação causa na célula espermática (GONZALES, 2004; KAROW, 2001). As características físico-químicas ideais que um crioprotetor penetrante deve possuir são: baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e uma baixa toxicidade celular (NASH, 1966).

A agilidade de um crioprotetor de se ligar ao hidrogênio da molécula de água é a mais importante característica de um bom crioprotetor (GONZALES, 2004; NASH, 1966). A toxicidade de um crioprotetor é influenciada por sua concentração, momento de adição e temperatura em que é realizada a exposição da célula ao agente (GONZALES, 2004; NASH, 1966).

Os crioprotetores penetrantes foram classificados por Ashwood-Smith (1987) em dois grupos, os dos álcoois e o das amidas. Os crioprotetores álcoois são principalmente o glicerol, o etilenoglicol (FICKEL; WAGENER; LUDWIG, 2007) e o metanol. Os crioprotetores amidas são a acetamida, a lactamida (KASHIWAZAKI *et al.*, 2006), a dimetilformamida (SILVA *et al.*, 2006) e a dimetilacetamida (CALDERAM *et al.*, 2008).

Muitos crioprotetores permeáveis à membrana, como por exemplo, o glicerol, o etilenoglicol e o propilenoglicol, foram testados na criopreservação de sêmen caprino. Porém, o mais utilizado ainda é o glicerol (BISPO, 2009).

O glicerol atua sobre a membrana admitindo a sua estabilização, evitando danos sobre a estrutura, que são gerados pela exposição da célula a elevadas concentrações de sais durante a congelação (HOLT; HEAD; NORTH, 1992). O seu efeito crioprotetor se relaciona à sua capacidade de ligação com a água e à baixa dissociação com sais, portanto, reduzindo a osmolaridade do meio de criopreservação. Isto ocorre por sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa. Modifica a formação de cristais de gelo, de modo que a lesão das células espermáticas durante a cristalização é reduzida, uma vez que este agente penetra na célula e substitui parcialmente seu conteúdo de água e eletrólitos (SINGH, 2006).

O glicerol, um crioprotetor celular, é largamente utilizado para a congelação de sêmen caprino, cuja concentração usada em diferentes estudos varia de 3 a 9%, com melhores resultados entre 4 e 7% do diluente utilizado (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000).



Em estudo sobre o etilenoglicol na criopreservação do espermatozoide caprino, Souza *et al.* (2002), observaram que o grupo que continha glicerol a 7% foi mais eficaz em preservar a motilidade pós-descongelação do que o grupo com etilenoglicol a 7%, embora não houve diferença ( $p > 0,05$ ), entre os grupos, em relação às alterações morfológicas.

Soares (2002) avaliou, em sêmen canino, a capacidade crioprotetora do etilenoglicol em diluente Tris-gema de ovo de galinha na manutenção da motilidade, do vigor e da morfologia espermática concluindo que, em determinadas concentrações, o etilenoglicol pode substituir o glicerol em diluentes à base de Tris-gema.

Os efeitos tóxicos que o glicerol exerce sobre os espermatozoides são apresentados por Hammerstedt e Grahan (1992) que descreveram uma provável interação molecular do glicerol com a membrana plasmática dos espermatozoides, alterando sua fluidez pela inserção na dupla camada lipídica, o que modifica a viscosidade citoplasmática e, dessa forma, afeta todas as reações metabólicas.

## **2.4 Água de Coco na Reprodução**

A água de coco tem sido empregada na biotecnologia da reprodução animal obtendo-se bons resultados com a utilização da mesma na preservação do sêmen de diversas espécies (NUNES, 1986)

Nunes (1986) realizou os primeiros trabalhos com a água de coco como diluente seminal, e a primeira espécie a ser usada foi a caprina, na cidade de Maceió no estado de Alagoas (Brasil), onde o sêmen dos caprinos eram avaliados após duas horas de incubação a 37 °C. Foram observados que tanto a motilidade progressiva como a porcentagem de espermatozoides móveis possuíam valores superiores quando o sêmen era diluído em uma solução de água de coco, quando comparados aos espermatozoides que eram diluídos em solução à base de leite desnatado (NUNES; SALGUEIRO, 1999).

Resultados similares foram encontrados ao utilizar os mesmos diluentes na refrigeração de sêmen a 4 °C e no uso para IA de cabras que haviam sido sincronizadas com tratamento hormonal. Na IA com o sêmen de caprinos diluído em água de coco e refrigerado a 4 °C encontrou-se uma taxa de parição superior a 60% (NUNES, 1986).

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

De acordo com Nunes (1986; 1987), o sêmen diluído em água de coco possui uma maior fertilidade quando comparado com o diluente à base de leite. Em um trabalho realizado por Freitas (1988), utilizando IA em cabras, com água de coco como diluente seminal, obteve-se um nascimento de 55,6% de fêmeas e 44,4% de machos. Este resultado sugere uma possível influência da água de coco sobre a pré-seleção de espermatozoides "X", influenciando desta maneira, uma maior taxa de fecundação dos espermatozoides portadores destes cromossomos.

Nunes, Combarous e Priscila (1994) isolaram uma molécula que ativa o metabolismo espermático; esta molécula é do grupo das auxinas o ácido 3-indol acético (IAA), que possui ação hormonal estimuladora de crescimento em vegetais.

Nunes e Salgueiro (1999) verificaram que na água de coco pode ter variações de acordo com o estágio de maturação e com a espécie do fruto, onde isso pode influenciar os resultados tanto *in vitro* como *in vivo*.

A adição de diluentes convencionais no sêmen de diferentes espécies aumentou a motilidade espermática e a taxa de fertilidade, além de permitir a sua conservação durante períodos mais longos (NUNES; COMBARNOUS, 1995). Cruz (1994) obteve uma fertilidade significativamente superior com o uso de sêmen ovino preservado por 48 horas a 4 °C em meio contendo IAA (40,74%) quando comparado com o sêmen em meio à base de leite (14,81%).

Devido aos bons resultados observados nos primeiros estudos com a água de coco *in natura* para conservação de células espermáticas realizadas por Nunes nos anos das décadas de 80 e 90, foi elaborado um meio de conservação à base de água de coco sob a forma de pó (ACP®), onde se caracterizou a padronização e estabilização da água de coco *in natura* através do processo de desidratação (SALGUEIRO; GONDIM; NUNES, 2002).

A partir do ano de 1997, começaram-se os estudos que levaram a uma padronização do fruto (coco) que se chamou de ideal para ser utilizado nos processos biológicos. A estabilização da água de coco retirado do fruto ideal só foi conseguida no ano de 2002. A água de coco processada possui estabilidade e longevidade, sem

problemas de acondicionamento mantendo todas as propriedades inerentes do produto original (SALGUEIRO; GONDIM; NUNES, 2002).

A partir daí, o insumo básico – ACP<sup>®</sup>, foi utilizado na elaboração de diversos diluentes para sêmen, com formulações ajustadas para as condições da fisiologia espermática de cada espécie, recebendo então uma denominação específica segundo a espécie: caprinos (ACP-101<sup>®</sup>), ovinos (ACP-102<sup>®</sup>), suínos (ACP-103<sup>®</sup>), peixes de água doce (ACP-104<sup>®</sup>), equinos (ACP-105<sup>®</sup>), cães (ACP-106<sup>®</sup>), aves (ACP-108<sup>®</sup>), bovinos e bubalinos (ACP-111<sup>®</sup>), humanos (ACP-113<sup>®</sup>), felídeos (ACP-117<sup>®</sup>).

E a partir de 2002, diversos estudos foram realizados para confirmar os dados já obtidos com o diluente com água de coco *in natura* e novos estudos foram realizados visando aprimorar a técnica: em caprinos (AGUIAR *et al.*, 2012; BANDEIRA *et al.*, 2012; CÂMARA *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2012; FURTADO *et al.*, 2019; MAIA FILHO *et al.*, 2012; MESQUITA *et al.*, 2004; NUNES; SALGUEIRO, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SALGUEIRO *et al.*, 2002; SALGUEIRO *et al.*, 2006; SALGUEIRO; NUNES, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2004; CORDEIRO *et al.*, 2003), ovinos (BARÇANTE *et al.*, 2016; BRITO *et al.*, 2012; BRITO *et al.*, 2014; BRITO *et al.*, 2019; CÂMARA *et al.*, 2012; CASTRO *et al.*, 2016; CAVALCANTE *et al.*, 2012; CAVALCANTE *et al.*, 2014; CORDEIRO *et al.*, 2004b; FARIAS *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2006; MAIA *et al.*, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2007; PONTES *et al.*, 2016; SALGUEIRO *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2016; CORDEIRO *et al.*, 2004a), suínos (BARROS *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2018; TONIOLLI *et al.*, 2012; TONIOLLI *et al.*, 2010; TONIOLLI *et al.*, 2013), peixes de água doce (CARVALHO *et al.*, 2014a; CARVALHO *et al.*, 2014b; LEITE-CASTRO *et al.*, 2011; LINHARES *et al.*, 2012; LINHARES *et al.*, 2015; LINHARES *et al.*, 2017; MELO-MACIEL *et al.*, 2015; SALMITO-VALDERLEY *et al.*, 2012; VIVEIROS-LEAL *et al.*, 2008), equinos (BRASILEIRO *et al.*, 2019; SAMPAIO NETO *et al.*, 2002), cães (BARBOSA *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2010; CARDOSO; SILVA; SILVA, 2005a; CARDOSO; SILVA; SILVA, 2005b; CARDOSO *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2007; CARDOSO *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011; CARDOSO *et al.*, 2012a; CARDOSO *et al.*, 2012b; MADEIRA *et al.*, 2010; MOTA FILHO *et al.*, 2011; MOTA FILHO *et al.*, 2013; MOTA FILHO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2018; SILVA; CARDOSO; SILVA, 2006; UCHÔA *et al.*, 2011; UCHÔA *et al.*, 2012a; UCHÔA *et al.*, 2012b), aves (FROTA *et al.*, 2014; LAVOR *et al.*, 2011; LAVOR *et al.*, 2012a; LAVOR *et al.*, 2012b; RONDON

*et al.*, 2008), bovinos (KUNKEL *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 20120), búfalos (ZORZETTO *et al.*, 2017), humanos (SILVEIRA *et al.*, 2015), felídeos (BARBOSA *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2016), e animais domésticos (NUNES; SALGUEIRO, 2006).

## **2.5 Composição Química Específica da Gema do ovo de Galinha (*Gallus gallus domesticus*; GOGD) e da Gema do ovo de Galinha D'angola (*Numida meleagris*; GONM)**

A gema de ovo (*Gallus gallus domesticus*) tem sido bastante utilizada para estabilizar as membranas biológicas, minimizando os efeitos negativos do choque térmico, uma vez que esta é bastante fluida e na refrigeração reduz essa fluidez (BISPO *et al.*, 2011).

A GOGD é um componente largamente utilizado na composição de diluentes de sêmen por apresentar propriedade nutritivas e protetoras de membrana contra o choque térmico. A principal substância encontrada no ovo é a LDL que é implicada como principal responsável pela resistência ao choque térmico e melhoria na motilidade (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002; MOUSSA *et al.*, 2002).

Os valores para gema de ovo e albumina (clara) são de 33,04% e 57,10% em *G. domesticus*, e de 32,68% e 50,3% em *N. meleagris*, respectivamente (ADENOWO, 1999).

A GOGD é composta principalmente por 68% de LDL, 16% de lipoproteínas de alta densidade, 10% de livetinas e 4% de fosvitinas, localizadas em duas frações facilmente separáveis, os grânulos e o plasma. O plasma corresponde a 78% da matéria seca da gema; enquanto os grânulos representam 22%. Na matéria seca da gema, podem-se encontrar 33% de proteínas e 63% de lipídios, divididos em triglicérides (43%), colesterol (2,6%) e fosfolipídios (18%), sendo estes compostos por 16% de fosfatidilcolina e 2% de fosfatidiletalonamida (ANTON; GANDEMER, 1997; JOLIVET *et al.*, 2006).

Os grânulos são estruturas microscópicas, irregulares e insolúveis na gema. São constituídos de 70% de lipovitelininas, que correspondem às lipoproteínas de alta densidade, 16% de fosvitinas e 12% de LDL. Eles representam 19 à 25% da matéria seca, 42 à 48% do conteúdo proteico e 15% dos fosfolipídios da gema. A vitelogenina, uma lipoproteína sintetizada no fígado materno por estímulo estrogênico,

sofre um processo enzimático durante sua passagem do plasma sanguíneo para o interior da gema, originando as lipovitelinas e as fosvitinas (JOLIVET *et al.*, 2006).

A molécula de lipovitelina é parecida com outras proteínas solúveis de formato globular, sendo uma mistura de dois componentes,  $\alpha$  e  $\beta$ -lipovitelinas, que se diferem por seu teor de fósforo. Já as fosvitinas são fosfoglicoproteínas com 10% de fósforo em sua constituição com 5 à 6% de resíduos glicídicos. Também apresentam dois componentes,  $\alpha$  e  $\beta$ , que se diferenciam pelo teor de fósforo em sua composição. Estes precipitados se juntam para formar os grânulos, sendo incorporadas pequenas quantidades de LDL durante este processo (DYER-HURDON; NNANNA, 1993; SIRVENTE *et al.*, 2007).

O plasma da gema de ovo *Gallus gallus domesticus* contém proteínas solúveis, sendo separado dos grânulos por meio da centrifugação. Este é composto por 85% de LDL e 15% de livetinas. As livetinas são proteínas que não estão intimamente associadas aos lipídios, sendo de três tipos principais:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -livetinas. Sua estrutura química é semelhante às proteínas do plasma sanguíneo, como albumina,  $\alpha$ -2-glicoproteínas, transferrinas e  $\gamma$ -globulinas. Diferentemente de outras proteínas da gema, as livetinas não são produzidas por indução hormonal, sendo as  $\alpha$  e  $\beta$ -livetinas produzidas no fígado, e a  $\gamma$ -livetina na medula óssea. Existem receptores específicos no oolema que controlam a entrada dessas proteínas na gema (BURLEY; EVANS; PEARSON, 1993; KUKSIS, 1992).

Com relação às lipoproteínas, vários estudos mostraram que a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) é a principal fonte de colesterol e de outros lipídios para os ovócitos. Sua produção no fígado aumenta consideravelmente durante a maturidade sexual da ave, devido à secreção de estrógeno. A VLDL contém mais de 80% de massa lipídica, composta principalmente por espécies apolares, como ésteres de colesterol e triacilgliceróis. As apoproteínas presentes estão representadas pelas apoproteínas-B e VLDL-II. A apoproteína-B, semelhante à apoproteína B-100 presente no plasma sanguíneo humano, também se encontra na molécula da LDL, sendo a VLDL-II a responsável por garantir a especificidade dos receptores das lipoproteínas de muito baixa densidade (EVANS; BURLEY, 1987; JOLIVET *et al.*, 2006).

Enquanto as lipoproteínas de alta densidade possuem 80% de proteínas na sua constituição contra 20% de lipídios, as lipoproteínas de baixa densidade são compostas por aproximadamente de 11 à 17% de proteínas e 89% de lipídios, sendo

estes divididos em triacilglicerol (69%), fosfolipídios (27%), colesterol e ésteres de colesterol (4%) (ANTON; GANDEMER, 1997; SOUSA *et al.*, 2007).

As LDL apresentam-se como uma microemulsão biológica com importantes partículas envolvidas no transporte e no metabolismo de colesterol. São formadas por uma estrutura esférica de 17 à 60 nm de diâmetro, apresentando um centro composto de triglicerídeos e ésteres de colesterol, rodeado por fosfolipídios e apoproteínas, sendo estas de pelo menos seis tipos diferentes. Aproximadamente 20% do peso total da partícula é atribuído à apoproteína B-100, que é responsável pelo reconhecimento das LDL por receptores específicos e pelo controle do seu metabolismo (REISINGER; ATKINSON, 1990). Como seus grupos hidrofílicos estão orientados para a superfície e os hidrofóbicos estão voltados para o interior, a LDL se mostra muito solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos, apresentando densidade de 0,982 g/mL (MARTINET *et al.*, 2003).

Anton *et al.* (2003), citaram que essas lipoproteínas, nas suas propriedades físicas e estruturais, possuem alta solubilidade e boa estabilidade, não demonstrando alterar sua estrutura em temperaturas extremas (-80 à 75 °C). Evans *et al.* (1968), verificaram que as proteínas presentes nas LDL, com alto e baixo peso molecular, são as mesmas, variando apenas o conteúdo de triglicerídeos e fosfolipídios. O tamanho dessas lipoproteínas aumenta devido ao aumento de lipídios no interior da molécula e ao aumento de fosfolipídios entre as proteínas. A microscopia eletrônica suporta esta teoria, pois evidencia que há a existência de uma estrutura mosaica em sua superfície, onde lipídios e proteínas ocupam áreas distintas e não interagem fortemente juntos, sendo os fosfolipídios responsáveis pela estabilidade lipídica da molécula (MARTINET *et al.*, 2003).

O ovo de galinha d'Angola (*Numida meleagri*) contém 83,3% de porção comestível e tem peso médio total de 35,4 g. A porção comestível contém níveis médios de proteína de 85,5% com perfil de aminoácido melhor que o ovo de galinha (*Gallus gallus Domesticus*). É uma boa fonte de ferro, tem um índice de aminoácidos de 1,52 g e uma relação de eficiência proteica de 3,21 g, ácidos gordurosos totais de 6,74 g / 100 g de amostra e uma energia de proteína de 49,3% (ADEYEYE, 2010).

As composições nutricionais aproximadas do ovo de *Gallus gallus domesticus*, *Gallus gallus híbrido* e *Numida meleagris* são mostrados no quadro 1.

**Quadro 1 – Comparação do valor nutricional do ovo (gema e clara) das espécies *Gallus gallus domesticus*, *Gallus gallus hibrido* e *Numida meleagris***

Nutrientes	<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>Gallus gallus hibrido</i>	<i>Numida meleagris</i>
Sódio (mg/100g)	850.00 ± 22,4 <sup>b</sup>	150.00 ± 7,16 <sup>a</sup>	191.00 ± 6,71 <sup>a</sup>
Potássio (mg/100g)	162.00 ± 5,88 <sup>a</sup>	197.50 ± 3,91 <sup>a</sup>	321.50 ± 7,62 <sup>b</sup>
Ferro (mg/100g)	3.50 ± 0,70 <sup>a</sup>	7.10 ± 0,11 <sup>b</sup>	12,45 ± 0,09 <sup>a</sup>
Cálcio (mg/100g)	2.90 ± 0,23 <sup>a</sup>	14.80 ± 0,91 <sup>b</sup>	26.60 ± 0,63 <sup>b</sup>
Vit. C (mg/100g)	121,50 ± 0,14 <sup>b</sup>	110,50 ± 0,16 <sup>ab</sup>	97,50 ± 0,71 <sup>a</sup>
Vit. A (mg/100g)	0,33 ± 0,88 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,91 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,62 <sup>a</sup>
Umidade mg/100g	60,45 ± 0,14 <sup>b</sup>	55,60 ± 0,16 <sup>a</sup>	50,50 ± 0,71 <sup>a</sup>
Proteína mg/100g	3,34 ± 0,88 <sup>a</sup>	3,85 ± 0,91 <sup>a</sup>	4,30 ± 0,62 <sup>a</sup>
Gordura mg/100g	27,65 ± 0,70 <sup>a</sup>	30,41 ± 0,22 <sup>a</sup>	31,49 ± 0,41 <sup>a</sup>
Cinza mg/100g	3,42 ± 0,23 <sup>b</sup>	1,50 ± 0,11 <sup>b</sup>	2,15 ± 0,25 <sup>ab</sup>

Fonte: Adaptado de Bashir *et al.* (2015).

O ovo das três espécies não mostrou nenhuma diferença no teor de proteína e gordura ( $p > 0,05$ ). Já o ovo de *Numida meleagris* apresentou maior quantidade de potássio, ferro, cálcio, e quatro vezes menos sódio que o de *G. domesticus*. (BASHIR *et al.*, 2015).

Geralmente ovos de aves têm forma oval com pequenas diferenças entre as espécies. Apesar de suas pequenas diferenças, a forma do ovo é considerada fator importante na caracterização das espécies de aves (BASHIR *et al.*, 2015).

A *Numida meleagris* produz números substanciais de ovos. Na França, esses animais foram melhorados não apenas para crescer rapidamente, mas também para uma grande postura, em média até 190 ovos por ano (ADEYEYE, 2010). A qualidade do ovo reflete em suas características e também determinam a aceitabilidade para os consumidores (SONG *et al.*, 2012). Os ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) têm sido amplamente estudados para avaliação de sua composição. No entanto, tais informações não são bem documentadas para outras espécies de aves, incluindo a *Numida meleagris* (OBIKE; OKE; AZU, 2011).

Os ovos são alimentos altamente versáteis, contendo muitos nutrientes. Ovos da maioria das espécies de aves podem ter semelhanças na sua composição; no entanto, informações sobre a qualidade dos ovos e características ainda são limitadas (DUDUSOLA, 2010). Até o ano de 2012, não havia relatos sobre a composição química da GONM.

Os primeiros dados de composição química da GONM (gema de ovo de *Numida meleagris*) foram relatados por Adeyeye (2010): umidade 49,80%, proteína bruta 15,74%, gordura bruta 31,91%, cinza bruta 1,86%, aminoácidos (glutamina

13,9%, aspartato 9,63%, leucina 8,07%, arginina 7,12%, lisina 7,01%, valina 5,61%, prolina 5,6%, glicina 5,6%, fenilalanina 5,56%, isoleucina 5,03%, serina 4,94%, alanina 4,7%, treonina 3,95%, tirosina 3,69%). Apesar da avaliação englobar vários aminoácidos o autor não determinou a quantidade de triptofano nas análises.

O quadro 2 apresenta a composição de minerais da gema de ovo das espécies *Gallus gallus domesticus*, *Gallus gallus hibrido* e *Numida meleagris*.

**Quadro 2 – Composição de minerais da gema de ovo das espécies *Gallus gallus domesticus*, *Gallus gallus hibrido* e *Numida meleagris***

Espécie	Minerais (mg / 100 g)			
	Sódio	Potássio	Ferro	Cálcio
<i>Gallus gallus domesticus</i>	850.000	162.00	3.50	2.90
<i>Gallus gallus hibrido</i>	150.50	197.50	7.10	14.80
<i>Numida meleagris</i>	191.00	321.50	12.45	26.60

Fonte: Adaptado de Adeyeye *et al.* (2010).

Analisando o quadro 2, no que se refere a comparação da composição de minerais, é possível observar que a GONM apresenta concentração maior de potássio, ferro e cálcio, quando comparados com a galinha híbrida e a doméstica, perdendo apenas na concentração de sódio, que foi maior na galinha híbrida. Esses dados são de extrema importância quando se trabalha com diluentes ou crioprotetores seminais, uma vez que minerais são essências para a viabilidade espermática; além disso, a concentração nos diluentes seminais deve estar em equilíbrio osmótico para evitar a degradação da membrana plasmática (ADEYEYE, 2010).

O teor de vitamina C foi de 121,50 GOGD; 110, 50 GOGH; e 97,50 mg/100g da gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM), respectivamente. Já o teor de vitamina A foi de 0,33 GOGD; 0,21 GOGH; e 0,31 mg/100g da gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM), respectivamente (ADEYEYE, 2010).

A concentração de vitamina C foi menor na GONM; no entanto, não houve uma discrepância nessa concentração. Os níveis de vitamina A foram basicamente semelhantes em GONM e GOGH. Atualmente diversos trabalhos demonstram a ação benéfica das vitaminas sobre a conservação das células espermáticas, como o trabalho realizado por Martinez-Paramo *et al.* (2012), que relatam que a vitaminas C é um antioxidante não enzimático que protege os espermatozoides de danos oxidativos do DNA e previnem a deterioração oxidativa de lipídios poli-insaturados presentes na membrana que rodeia as células e as organelas.



A gema do ovo de *Gallus gallus domesticus* tem sido utilizada na biotecnologia da reprodução como ingrediente essencial nos meios diluentes para refrigeração e congelação de espermatozoides em várias espécies domésticas (NEVES; HENRY, 2012). Mesmo assim, ainda há uma escassez de informações acerca das qualidades nutricionais dos ovos de aves domésticas (BASHIR *et al.*, 2015), principalmente nas concentrações de fosfolípidios. Gema de ovo de galinha é o ingrediente mais usual em diluentes de sêmen de mamíferos para preservar os espermatozoides contra crioinjúrias durante o processo de congelação-descongelação (BENCHARIF *et al.*, 2008; FOROUSANFAR *et al.*, 2010).

Está provado que a fração de LDL da GOGD é responsável pelo efeito crioprotetor durante o processo de criopreservação de espermatozoides de mamíferos (BERGERON; MANJUNATH, 2006; MOUSSA *et al.*, 2002). Além disso, os fosfolípidios da GOGD, como fosfatidilcolina são muito importantes para a manutenção de integridade da membrana espermática durante o processo de congelação-descongelação (BERGERON; MANJUNATH, 2006). De acordo com Forousanfar *et al.* (2010), um dos grandes entraves na utilização da GOGD em diluentes está relacionado com a ampla variabilidade de sua composição.

## 2.6 Crioinjúrias Celulares

A exposição dos espermatozoides a condições extremamente desfavoráveis como o processo de criopreservação promove um processo de grande estresse celular, comprometendo a viabilidade espermática (PURDY, 2006).

Os processos de congelação e descongelação do sêmen induzem danos bioquímicos, funcionais e ultraestruturais aos espermatozoides (WATSON, 2000), resultando em redução da motilidade, integridade de membrana e capacidade de fertilização (PURDY, 2006).

Particularmente, a congelação induz injúrias diretas às células, explicadas por duas hipóteses dependendo da taxa de congelação do sistema: a formação de gelo intracelular a taxas rápidas de congelação e o “efeito solução” a taxas lentas de congelação (MAZUR, 1970).

Quando a taxa de congelação é rápida, a água intracelular congela e forma cristais de gelo, tidos como letais para a célula. Por outro lado, quando a taxa de congelação é lenta os cristais de gelo se formam na solução extracelular primeiro, o

que gera um aumento na concentração de eletrólitos da fração não congelada. O aumento na concentração induz, conseqüentemente, desidratação celular através de uma diferença de pressão osmótica. Se a desidratação é severa, toxicidade ou injúria celular pode ser induzida devido à alta concentração de eletrólitos, o que é denominado de “efeito solução” (FAHY, 1980).

Sabe-se que a formação de cristais intracelulares é letal e consiste no principal mecanismo de danos envolvido quando usadas taxas rápidas de congelação (TONER; CRAVALHO; KAREL, 1993), mas, a injúria pelo “efeito solução” não está completamente compreendida (HAN; BISCHOLF, 2004).

A utilização adequada de diluentes e aditivos crioprotetores pode reduzir os danos das células espermáticas (JEYEDRAN *et al.*, 2008). O choque térmico que ocorre nas células espermáticas de mamíferos submetida à refrigeração rápida da temperatura corpórea ( $\pm 38$  °C) a temperaturas próximas a 5 °C repercute na viabilidade espermática, uma vez que ocorre um decréscimo irreversível da motilidade espermática, assim como mudanças na bioquímica e no funcionamento dos espermatozoides, como: redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento da degeneração do ácido desoxirribonucleico e liberação de material intracelular (WATSON, 2000).

Borges *et al.* (2011), relataram que a sensibilidade ao choque térmico varia conforme a espécie animal, quantidade e composição do plasma seminal. Os mesmos autores afirmaram que a sensibilidade ao choque térmico pode ser determinada pelo conteúdo de colesterol da membrana, grau de saturação dos ácidos graxos, tipo de fosfolipídios e quantidade de proteína presente na membrana.

A congelação espermática de forma rápida, aliado à descongelação lenta, resultará em danos causados pela formação de pequenos cristais de gelo. Esses cristais podem se agrupar e formar grandes cristais, que rompem a membrana (WATSON, 2000). De acordo com Snoeck (2003) a melhor curva de congelação deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides se desidratem, e rápida o bastante para evitar que as células espermáticas fiquem expostas por muito tempo às elevadas concentrações de soluto.

Após o processo de descongelação Azêredo *et al.* (2001), observaram uma diminuição na motilidade do sêmen caprino. A eficiência do glicerol e do etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino foi avaliada por Bittencourt *et*

al. (2004). Os autores concluíram que o glicerol a 7% proporcionou maiores taxas de motilidade, todavia também foi observado mais alterações morfológicas.

## 2.7 Avaliação da Viabilidade Espermática “In Vitro” Pós-Descongelção

### 2.7.1 Padrões do sêmen caprino segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA)

Após a colheita, o sêmen caprino deve ser avaliado conforme as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Os ejaculados são avaliados quanto ao volume (0,5 a 2,0 mL), cor (branca a acinzentada), aspecto (cremoso, leitoso ou aquoso), turbilhonamento (0-5), vigor (0-5), motilidade total (0-100%), viabilidade, morfologia e a concentração espermática, sendo esta, mensurada em câmara de Neubauer (espermatozoides/mm<sup>3</sup>) (Quadro 3-5) (MANUAL CBRA, 2013).

#### Quadro 3 – Características desejáveis do ejaculado de caprinos coletados por vagina artificial

Características	Valores
Volume	0,5 – 1,5 mL
Cor	Branca ou amarelo-marfim
Odor	“sui generis”
Movimento de massa	≥ 4
Motilidade espermática	80 (70-90%)
Vigor	≥ 3
Concentração espermática	2-5 x 10 <sup>9</sup> / mL
Nº total espermatozoides/ejaculado	3-5 x 10 <sup>9</sup>
Espermatozoides morfológicamente normais	≥ 80%

Fonte: Adaptado do Manual do CBRA (2013).

#### Quadro 4 – Características desejáveis para a dose de espermatozoides refrigerados

Características	Valores
Motilidade espermática	≥ 60%
Vigor	≥ 3
Dose inseminante convencional	150x10 <sup>6</sup> spz móveis
Volume da dose	0,025 - 0,050 mL
Espermatozoides normais	≥ 80%
Defeitos maiores	≤ 10%

Fonte: Adaptado do Manual do CBRA (2013). Spz = espermatozoides.

### Quadro 5 – Características desejáveis para dose de espermatozoides congelados

Características	Valores
Motilidade espermática	≥ 30%
Vigor	≥ 2
Nº sptz por palheta (0,25 e 0,50)	40x10 <sup>6</sup> móveis
Espermatozoides normais	≥ 80%
Defeitos maiores	≤ 10%

Fonte: Adaptado do Manual do CBRA (2013). Sptz = espermatozoides.

#### 2.7.2 Cinética espermática

A avaliação da cinética espermática é essencial na análise da qualidade do sêmen (MATOS *et al.*, 2008). Com intuito de amenizar a variabilidade devido a subjetividade humana, foram desenvolvidos vários sistemas de Análise de Sêmen Auxiliada por Computador (CASA – *Computer-assisted Sperm Analyser*), definida como um sistema automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozoides, fornecendo informação acurada, precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozoide (AMANN; KATZ, 2004).

O CASA permite uma mensuração objetiva de diferentes características da cinética espermática, mostrando alto nível de precisão e segurança, sendo atualmente utilizado como uma ferramenta para melhorar o nosso conhecimento e habilidade para manipular espermatozoides. Esse sistema tem demonstrado ser uma ferramenta útil no monitoramento da qualidade espermática de amostras submetidas a diferentes tratamentos experimentais (FARREL *et al.*, 1996), na pesquisa de novos diluentes seminais, crioprotetores ou outros tipos de processamento (AMANN; KATZ, 2004). Como também, tem sido valioso na quantificação da hiperativação, no estabelecimento da relação entre qualidade do sêmen do doador e a verdadeira fertilidade da amostra e nas avaliações gerais da conveniência do uso de machos para reprodução (FARREL *et al.*, 1996; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; MATOS *et al.*, 2008).

**Figura 1 – Representação gráfica da análise de velocidades e amplitude de deslocamento lateral da cabeça por meio do software Sperm Class Analyzer (SCA®, Microptics, S.L., Barcelona, Espanha)**



Fonte: Adaptado de Mortimer (1997).

Os parâmetros cinéticos comumente obtidos através de analisadores de sêmen computadorizados são: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear (VSL), linearidade (LIN), índice de oscilação ou retilinearidade (STR), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), e frequência do batimento cruzado (BCF) (Quadro 6; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; ARRUDA *et al.*, 2011).

Os três parâmetros de velocidade (VCL, VAP, VSL) são comumente utilizados para a descrição geral do movimento do espermatozoide, entretanto, para uma avaliação adicional, foram estabelecidos os parâmetros LIN e STR, que tratam das relações entre estas velocidades (Fig. 1; MORTIMER, 1997).

**Quadro 6 – Parâmetros informativos de motilidade espermática obtidos através do software Sperm Class Analyzer (SCA®, Microptics, S.L., Barcelona, Espanha)**

(continua)

Parâmetro	Sigla	Unidade	Descrição
Motilidade total	MT	%	Percentual de espermatozoides móveis
Motilidade progressiva	MP	%	Percentual de espermatozoides progressivos
Velocidade curvilínea	VCL	µm/s	Velocidade da trajetória real do espermatozoide
Velocidade média da trajetória	VAP	µm/s	Velocidade da trajetória média do espermatozoide
Velocidade linear	VSL	µm/s	Velocidade em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide
Linearidade	LIN	%	Relação percentual entre VSL e VCL

(conclusão)

Index de oscilação ou retilinearidade	STR	%	Relação percentual entre VAP e VCL
Amplitude do deslocamento lateral da cabeça	ALH	µm/s	Deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real em relação à trajetória média ou linear
Frequência do batimento cruzado	BCF	µm/s	Frequência que a cabeça do espermatozoide atravessa a trajetória média

Fonte: Adaptado de Mortimer (1997).

### 2.7.3 Morfologia espermática

A análise morfológica deve ser realizada sob imersão (aumento de 1.000x) onde as primeiras 200 células observadas são classificadas quanto aos defeitos de forma e estrutura. A estrutura do espermatozoide é formada por cabeça, colo, peça intermediária e flagelo, sendo este último subdividido em peça principal e peça terminal (BARTH; OKO, 1989; RICARTE; SILVA, 2010). A cabeça do espermatozoide é formada principalmente pelo núcleo. Entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo existe o acrossoma, uma estrutura de dupla camada de membranas que contém enzimas (hialuronidase e acrosina) responsáveis pela destruição do *cumulus oophorus* e da zona pelúcida do oócito durante a fecundação (BEARDEN; FUQUAY, 1997; RICARTE; SILVA, 2010).

Como o espermatozoide é uma célula translúcida, sua visualização sob microscopia óptica comum não é muito nítida para avaliação do contorno celular; por isso, quando se dispõe somente de microscopia óptica comum deve-se fazer uso da técnica de esfregaço corado. De forma geral, as características morfológicas espermáticas são analisadas usualmente utilizando-se esfregaços corados como rosa de bengala, giemsa, eosina-nigrosina, azul de bromofenol e outros (CBRA, 2013).

A alta frequência de espermatozoides morfológicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade. As anormalidades morfológicas são classificadas de diversas formas, sendo que algumas classificações dividem as alterações de acordo com a região: cabeça, peça intermediária e cauda, ou em primários e secundários, ou defeitos maiores e menores (HOWARD *et al.*, 1988).

Uma técnica bastante simples de determinação da integridade de membrana é pelo método de coloração supravital eosina-nigrosina, técnica que pode ser realizada a campo, fazendo o uso de um microscópio óptico de fundo claro (PAPA *et al.*, 2014). A técnica consiste na penetração do corante, que contém componentes

permeabilizantes (eosina), através da membrana lesada, o que permite a diferenciação entre células viáveis e não viáveis, embora menos específica que outras técnicas como as sondas fluorescentes (COLENBRANDER; GADELLA; STOUT, 2013).

Para a avaliação da morfologia espermática na espécie caprina é recomendado que o percentual de espermatozoides normais seja igual ou superior a 80% e que o percentual de espermatozoides com defeitos maiores seja igual ou inferior a 10% (CBRA, 2013).

#### 2.7.4 Microscopia de fluorescência

A utilização de sondas fluorescentes tornou-se uma importante ferramenta para avaliar a funcionalidade da célula espermática (RODRIGUES *et al.*, 1994). O iodeto de propídio (IP) é largamente utilizado para avaliar a integridade da membrana espermática, pois somente penetra nas células com membrana lesada emitindo fluorescência vermelha após ligação específica com o DNA (GARNER *et al.*, 1986; GRAHAM *et al.*, 1990; GARNER *et al.*, 1994; CELEGHINI *et al.*, 2010).

#### 2.7.5 Teste hiposmótico

Quando um espermatozoide é exposto a uma solução hiposmótica, aqueles funcionais absorvem a água, desencadeando um mecanismo de equilíbrio entre a solução e o meio. Assim, há a ingurgitação celular, pois, a água vai para o meio menos concentrado, levando a um inchaço característico. Essa pressão intracelular faz com que a haja o enrolamento da cauda, desta forma podendo identificar os espermatozoides lesionados e não-lesionados. Os espermatozoides que não possuem a membrana íntegra não fazem troca osmótica, permanecendo com a cauda reta (COLENBRANDER; STOUT, 2011). A leitura é realizada em microscópio de contraste de fase com o aumento de 400 x, sendo realizada uma contagem de 200 espermatozoides. O resultado é expresso em porcentagem de espermatozoides íntegros ou reativos ao teste osmótico (CBRA, 2013).

### 2.7.6 Método Cometa

É um método de eletroforese em microgel para detecção e quantificação de quebras das fitas do DNA, em células individuais, usando microscopia e pH alcalino (pH > 13) (PARK; CHOI, 2007; ZAIA, 2015).

Em animais, poucos estudos com o ensaio Cometa foram desenvolvidos. Simões (2010) padronizou a técnica para espermatozoides bovinos. No trabalho, não foi observada correlação entre a técnica e o CASA. Ademais, foi necessária a adaptação da técnica para a espécie, pois o espermatozoide bovino parece possuir uma compactação do material genético muito maior que a encontrada em espermatozoides humanos (SIMÕES, 2010).

O método baseia-se na lise de membranas celulares, seguida pela indução da migração eletroforética (microeletroforese) do DNA liberado em matriz de agarose (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009). A célula migrada, quando vista no microscópio, adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça, a região nuclear, e cauda, a qual contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009).

Partindo-se do princípio de que a maioria dos agentes genotóxicos induzem mais quebras em fitas simples do que em fitas duplas do DNA, a versão alcalina da técnica apresenta maior sensibilidade para a detecção da indução de danos ao DNA (TICE *et al.*, 2000). Isso se dá pelo fato de que, durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespiralização dos sítios de rompimento da molécula do DNA (ROJAS *et al.*, 1999).

O biomarcador genético se desenvolveu rapidamente e ganhou popularidade, tornando-se amplamente utilizado como ferramenta no biomonitoramento (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003; ZAIA, 2015).

Adicionalmente, as vantagens incluem a sua simplicidade (análise de pequeno número de células), rápido desempenho, e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA em qualquer tipo de célula, desde que nucleada (GONÇALVES *et al.*, 2003). Uma desvantagem deste teste é a diversidade de métodos para quantificação do dano, podendo ser utilizado: o tamanho da cauda comparada ao núcleo, à porcentagem e intensidade de fragmentação da cauda, ou até mesmo ambas as medições (MOREIRA, 2010).



Logo, a padronização do método de interpretação dos resultados é essencial para análise dos dados. Além disso, novos estudos com células somáticas estão direcionando a associação do ensaio cometa com a mensuração da suscetibilidade ao estresse oxidativo e com a hibridização *in situ* (SHAPOSHNIKOV; FRENGER; COLLINS, 2009; COLLINS, 2008).

#### 2.7.7 Avaliação ultraestrutural

A avaliação da ultraestrutura permite a análise da célula espermática em uma proporção subcelular que não é observada em microscopia óptica. Essa avaliação é importante para observar possíveis alterações estruturais dos componentes do espermatozoide que possam ocorrer na escala nanométrica. Nesta escala, as alterações somente podem ser observadas em equipamentos mais precisos, como o microscópio eletrônico de transmissão (SILVA, 2010).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta utilizada para determinar o tamanho e a forma das estruturas inorgânicas e biológicas baseada na interação dos elétrons incidentes sobre a matéria (SILVA, 2010).

A utilização da MET como técnica de avaliação espermática é substancialmente menor que as demais avaliações espermáticas, devido principalmente ao custo operacional da técnica. No entanto, é uma técnica de grande importância devido à possibilidade de avaliação das estruturas da célula espermática em uma escala muito pequena, favorecendo a visualização de alterações não observadas por meio dos testes comuns.

Testes de avaliação da ultraestrutura dos espermatozoides já foram realizados em diferentes espécies de animais tais como cães (SILVA *et al.*, 2009), bovinos (CAIXETA, 2020; LUQUE; BAO, 2006), caprinos (SOARES *et al.*, 2011), ovinos (PIVKO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011), galos (SOARES; BELLETTI, 2006) e jumentos (CRESPILHO *et al.*, 2006). Os testes possibilitaram a avaliação de modificações ultraestruturais após a manipulação do sêmen, principalmente no processo de congelação-descongelação, que não eram observados em testes utilizando microscopia óptica (HASHIDA *et al.*, 2005, SILVA *et al.*, 2009; SILVA; GERRA, 2011).

Portanto, a utilização de avaliações laboratoriais que permitam analisar as funções espermáticas associada à avaliação ultraestrutural do espermatozoide

permite uma análise das célula espermática após o contato com diferentes substâncias ou após alterações de temperaturas. Desta forma, é importante utilizar-se destas ferramentas para uma investigação criteriosa da interação dos espermatozoides com as substâncias dos diluentes.

Em estudos realizados por Moura *et al.* (2013) a avaliação qualitativa da ultraestrutura dos espermatozoides por meio da MET possibilitou identificar danos espermáticos que não seriam perceptíveis na análise por microscopia óptica. Assim, apesar desse método não ser utilizado rotineiramente na avaliação do sêmen de cães, em virtude do custo elevado de processamento, ressalta-se a importância de sua utilização, visando predizer *in vitro* a viabilidade espermática *in vivo*, uma vez que não foi realizada IA utilizando amostras de sêmen descongeladas sob diferentes temperaturas (SILVA *et al.*, 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a viabilidade *in vitro* do sêmen caprino criopreservado em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c®) acrescido de crioprotetor contendo gema de ovo de galinha d'Angola (*Numida meleagris*).

#### 3.2 Específicos

- a) Realizar a bioprospecção da gema de ovo de galinha d'Angola (*N. meleagris*) através de revisão sistemática;
- b) Realizar a avaliação bromatológica da gema de ovo de galinha d'Angola (*N. meleagris*);
- c) Elaborar diluente para sêmen caprino à base de ACP-101c® acrescido de gema de ovo de galinha d'Angola (*N. meleagris*) como crioprotetor externo alternativo (ACPote);
- d) Avaliar a viabilidade dos espermatozoides caprinos preservados em ACPote sobre:
  - Avaliar os parâmetros espermáticos caprinos (turbilhonamento, motilidade e vigor) do sêmen fresco (análise subjetiva) e descongelado (análise objetiva utilizando o sistema CASA);
  - Avaliar a morfologia espermática caprina pós-descongelação por meio da análise subjetiva;
  - Avaliar a viabilidade espermática caprina (integridade de membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial) por meio da técnica de imunofluorescência;
  - Avaliar a integridade do DNA espermático caprino, por meio do método cometa;
  - Avaliar a integridade morfológica das membranas e organelas (avaliação dos danos ultraestruturais) dos espermatozoides caprinos por meio da análise de microscopia eletrônica de transmissão.

1 **4 CAPITULO I**

2  
3  
4  
5 **Assessment of coconut water added to *Numida meleagris* egg yolk as**  
6 **cryoprotectant for goat sêmen**

7 (*Avaliação da água de coco em pó acrescida da gema de ovo de *Numida meleagris**  
8 *como crioprotetor para sêmen caprino*)

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21 Periódico: *Animal Reproduction (A4)*  
22 (Submetido em 01/11/2021, versão inglês)

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30 **Avaliação da água de coco em pó acrescida da gema de ovo de *Numida meleagris* como**  
31 **crioprotetor para sêmen caprino**

32 Laércio Fontinele Bandeira de Macêdo<sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-5417-3033>), Leticia  
33 Soares de Araújo Texeira<sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-1630-6904>), Clarissa de Castro e  
34 Braga<sup>3</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-2658-9111>), Kenney de Paiva Porfírio<sup>4</sup>  
35 (<https://orcid.org/0000-0001-5195-0434>), Sara Camila da Silveira Costa<sup>5</sup>  
36 (<https://orcid.org/0000-0003-0381-0116>), Louis Henrique Miyauchi Silva<sup>5</sup>  
37 (<https://orcid.org/0000-0002-5653-2263>), Wcleuden Matias Nascimento<sup>1</sup>  
38 (<https://orcid.org/0000-0002-0264-2942>), Francisca Kelly dos Santos Silva<sup>3</sup>

1 (https://orcid.org/0000-0002-2084-584x), Nildene Silva Andrade Bandeira<sup>6</sup>  
 2 (https://orcid.org/0000-0003-4723-8983), Rômulo José Vieira<sup>7</sup> (https://orcid.org/0000-0002-  
 3 4154-3858), Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro<sup>7</sup> (https://orcid.org/0000-0002-3997-1694),  
 4 Cristiane Clemente de Mello Salgueiro<sup>8</sup> (https://orcid.org/0000-0003-0071-4030), José  
 5 Ferreira Nunes<sup>8</sup> (https://orcid.org/0000-0003-1189-0937), Janaina de Fátima Saraiva Cardoso<sup>7</sup>  
 6 (https://orcid.org/0000-0002-4484-4403), Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>7\*</sup>  
 7 (https://orcid.org/0000-0002-0484-3748)

8 <sup>1</sup>Universidade do Estado do Ceará, Programa de Pós-graduação em biotecnologia em saúde  
 9 humana e animal, Mestrado Profissional em Saúde Humana e Animal, Brasil,  
 10 laerciofbj@hotmail.com, wcleudemmatias@hotmail.com

11 <sup>2</sup>Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical, Brasil,  
 12 leticiasoaiteixeira@gmail.com

13 <sup>3</sup>Universidade Federal do Piauí, Programa de Residência em Área Profissional da Saúde, Brasil,  
 14 clah\_1995@hotmail.com, fkelly2209@gmail.com

15 <sup>4</sup>Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Brasil,  
 16 kenney@ufpi.edu.br

17 <sup>5</sup>Universidade Federal do Piauí, Brasil, saracostapink@hotmail.com,  
 18 [louishms@hotmail.com.br](mailto:louishms@hotmail.com.br)

19 <sup>6</sup>Centro Universitário Internacional, Programa de Pós-Graduação em Auditoria de Serviços de  
 20 Saúde, Terseina, Piauí, Brasil, nildeneandrade@hotmail.com

21 <sup>7</sup>Universidade Federal do Piauí, Professor, Departamento de Clínica Cirúrgica Veterinária,  
 22 Brasil, rvieirasb@yahoo.com.br, lysbarradas@ufpi.edu.br, janainadefatima@hotmail.com,  
 23 neyromulo@ufpi.edu.br

24 <sup>8</sup>Universidade Estadual do Ceará, Professora, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
 25 em Saúde Humana e Animal, Brasil, cristiane.mello@uece.br, nunesuece@gmail.com

26 \* Autor para correspondência, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Universidade  
 27 Federal do Piauí. Endereço de e-mail: neyromulo@ufpi.edu.br

## 28 **Resumo**

29 Objetivou-se avaliar os efeitos dos diluentes TRIS e ACP - 101c<sup>®</sup> adicionados a diferentes  
 30 concentrações da gema de ovo de galinha d'angola (*Numida meleagris*). Para tanto, foram  
 31 colhidos quinze ejaculados de cinco caprinos da raça Anglo Nubiana. Em seguida, os ejaculados  
 32 foram reunidos em um *pool*, e este foi dividido em 12 grupos, sendo dois grupos controles (GC1  
 33 TRIS, com adição 2,5% da gema de ovo de galinha *Gallus gallus domesticus* GOGD), (GC2  
 34 Grupo Controle ACP - 101c<sup>®</sup>, com adição de 2,5% de gema de ovo de galinha *Gallus gallus*

1 *domesticus*, GOGD) e dez grupos experimentais (GE), com a adição de diferentes  
2 concentrações de gema de ovo de galinha d'Angola (*Numida meleagris*, GONM) em meios  
3 TRIS e ACP. Seguidamente, procedeu-se a criopreservação e armazenamento em nitrogênio  
4 líquido (-196 °C). Após sete dias, as amostras foram descongeladas e avaliadas quanto à cinética  
5 espermática, análise de membranas por imunofluorescência e morfologia espermática. Na  
6 análise dos grupos contendo GONM pelo sistema CASA, observou-se que vários parâmetros  
7 foram semelhantes aos dos grupos contendo GOGD ( $P>0,05$ ). A integridade da membrana, o  
8 potencial mitocondrial e o acrossomo não sofreram influência dos tratamentos ( $P>0,05$ ), assim  
9 como dos diluentes empregados para criopreservação ( $P>0,05$ ). A morfologia espermática foi  
10 igualmente preservada pelas diferentes concentrações de GOGD e GONM nos diluentes de  
11 ACP<sup>®</sup> e TRIS, sem diferenças significativas estatísticas ( $P<0,05$ ). Conclui-se que a gema de  
12 ovo de *Numida meleagris* pode ser utilizada eficazmente como crioprotetor externo de  
13 membrana, acrescida aos diluentes ACP-101c<sup>®</sup> e TRIS.

14 **Palavras-chave:** Caprino, Sêmen, Crioprotetor, Gema de ovo

## 15 **1. Introdução**

16 Sabe-se que vários meios diluentes/crioprotetores já foram elaborados a fim de conferir  
17 aos espermatozoides energia, proteção contra crioinjúrias e manutenção de um ambiente  
18 adequado para sua sobrevivência. Esses meios utilizados podem apresentar na composição uma  
19 variedade de substâncias, como: citrato de sódio, gema de ovo, lactose, Tris (hidroximetil  
20 aminometano), crioprotetores internos ou penetrantes (glicerol, etilenoglicol ou dimetil  
21 sulfóxido), sais (citrato de sódio ou ácido cítrico) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina)  
22 (Purdy, 2006).

23 Ademais, estudos continuam sendo desenvolvidos, visando a descoberta de novos meios  
24 diluentes/crioprotetores que confirmam uma melhor proteção às células espermáticas durante as  
25 etapas de criopreservação. E, nesse contexto, a água de coco tem sido elencada positivamente  
26 para esse objetivo, pois é uma solução estéril, pouco ácida, composta de gorduras neutras,  
27 indutores ou fatores de crescimento estimuladores da divisão celular e diversos eletrólitos. Isso  
28 confere a água de coco uma densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo. Além disso,  
29 já foi relatado que a água de coco fornece nutrientes necessários para a sobrevivência e  
30 viabilidade de gametas masculinos e femininos durante o processo de criopreservação  
31 (Carvalho et al., 2006).

32 Pesquisas demonstram resultados satisfatórios quanto da utilização de  
33 diluentes/crioprotetores à base de água de coco *in natura* para conservação de células  
34 espermáticas de várias espécies animais, como, por exemplo, caninos (Cardoso et al., 2003),

1 ovinos (Machado et al., 2006) e caprinos (Salgueiro et al., 2002) e entre outros. E com base  
2 nesses estudos a água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>) foi desenvolvida, e tem sido viável como meio  
3 diluente para criopreservação seminal na espécie caprina (Salgueiro et al., 2003). No entanto,  
4 alguns trabalhos apontam a necessidade da realização de mais pesquisas, visando a otimização  
5 desse meio diluente na criopreservação do sêmen caprino.

6 Vale ressaltar, quanto aos meios diluentes/crioprotetores, que a gema de ovo de galinha  
7 (*Gallus gallus domesticus*) é o ingrediente mais utilizado nas espécies de mamíferos  
8 domésticos, atribuindo proteção dos gametas masculinos submetidos ao processo de  
9 congelação-descongelação (Forouzanfar et al., 2010). Já a gema de ovo da galinha d'Angola  
10 (*Numida meleagris*) ainda não havia sido avaliada em estudos relacionados a meios  
11 diluentes/crioprotetores de sêmen de mamíferos domésticos.

12 Neste contexto, objetivou-se avaliar a viabilidade *in vitro* do sêmen caprino  
13 criopreservado em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c<sup>®</sup>) acrescido de um  
14 crioprotetor alternativo, a gema de ovo da galinha d'Angola (*Numida meleagris*).

## 15 **2. Material e métodos**

### 16 2.1. Ética em experimentação animal

17 O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da  
18 Universidade Estadual do Piauí (CEUA/UESPI), sob o número de protocolo 07614/2018, em  
19 20/07/2018. Para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei N<sup>o</sup>  
20 11.794, de 08 de outubro de 2008, Decreto N<sup>o</sup> 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas  
21 editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), Brasil.

### 22 2.2. Animais e local de realização do experimento

23 A pesquisa foi desenvolvida no setor de reprodução animal, da Universidade Federal do  
24 Piauí, *Campus* da Socopo, Teresina, Piauí, Brasil, cujas coordenadas geográficas são: 5° 03'  
25 23,1'' de Latitude Sul e 42° 47' 27,9'' de Longitude Oeste, com altitude média de 72,7 metros.

26 Foram utilizados cinco reprodutores da espécie caprina, da raça Anglo Nubiana, puros  
27 de origem, com idade média de quatro anos, clinicamente saudáveis e com escore de condição  
28 corporal de 3,5 numa escala de (0-5). Os animais utilizados foram provenientes de uma fazenda  
29 localizada no município de Campo Maior, no estado do Piauí, Brasil, cujas coordenadas  
30 geográficas são: Latitude 4°51'35,75'' S e Longitude 42°12'47,18'', com altitude média de 129  
31 metros. Os animais recebiam na alimentação diária volumoso (*Pennisetum purpureum Schum*),  
32 concentrado comercial (ração peletizada com teor de 20% proteína bruta, 300 g/animal/dia), sal  
33 mineral específico para a espécie caprina (Caprinofós<sup>®</sup>, Tortuga, DSM, São Paulo, Brasil) e  
34 água a vontade.

1 Os reprodutores foram submetidos ao exame clínico reprodutivo completo, visando a  
2 avaliação da higidez geral e do aparelho reprodutivo, seguindo os critérios estabelecidos pelo  
3 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Brasil (CBRA 2013).

#### 4 2.3. Avaliação bromatológica da gema de ovo da galinha d'Angola (*Numida meleagris*)

5 Foram utilizados ovos de galinha d'Angola (*Numida meleagris*), criadas em sistema  
6 extensivo, com postura em intervalo médio de cinco dias, provenientes de pequenos produtores  
7 rurais da microrregião de Campo Maior-PI. As aves recebiam como alimento sementes, insetos,  
8 grãos de milho e matéria seca de gramíneas nativas de capim mimoso (*Axonopus purpusii Chas*)  
9 e outras espécies *Mésosetum*, *Axonopus*, *Pás palum*, *Panicum* e *Eriochloqde*. Além disso,  
10 recebiam concentrados energéticos e proteicos de forma sólida em comedouros e  
11 disponibilidade de água *ad libitum*.

12 As análises bromatológicas foram realizadas na Universidade Federal do Piauí (UFPI),  
13 no Centro de Ciências da Saúde (CCS), Departamento de Nutrição, no Laboratório de  
14 Bromatologia e Bioquímica de Alimentos (LBROMBIOQ) e no Laboratório de  
15 Desenvolvimento de Produtos e Análise Sensorial de Alimentos (LASA).

16 As análises da matéria seca, cinza, extrato etéreo, lipídio, carboidratos e proteínas foram  
17 realizadas de acordo com a metodologia descrita pela Associação Oficial de Química Analítica  
18 (Aoac 2006).

19 A determinação de umidade foi realizada por gravimetria, pelo método de secagem em  
20 estufa com temperatura de 105 °C. Já as cinzas foram determinadas por incineração em forno  
21 mufla, a temperatura de 550 °C. Os lipídios (correspondentes à fração extrato estéreo) foram  
22 obtidos pelo método de extração intermitente de óleos e gorduras, em extrator de Soxhlet,  
23 utilizando o solvente éter de petróleo. A determinação de proteínas foi realizada pelo método  
24 de macro Kjeldahl, onde o fator de 6,25 foi utilizado para converter o teor de nitrogênio total  
25 em proteína. O teor de carboidratos foi obtido por diferença dos demais constituintes da  
26 composição centesimal (umidade, cinzas, lipídios e proteínas).

27 O valor calórico do “nugget” em estudo foi calculado utilizando-se os fatores de  
28 conversão de ATWATER: 4 kcal/g para proteínas, 4 kcal/g para carboidratos e 9 kcal/g para  
29 lipídios (Watt et al., 1963).

30 Posteriormente, os teores de carotenoides totais foram determinados de acordo com a  
31 metodologia já estabelecida (Alvarez-Suarez et al., 2011), utilizando o solvente acetona/hexano  
32 e todos os extratos foram elaborados de acordo com a metodologia padronizada (Rufino et al.,  
33 2010).



1 Por fim, a atividade antioxidante foi determinada pelo método de captura de radicais,  
2 utilizando o radical DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil).

#### 3 2.4. Colheita de sêmen e avaliação espermática

4 Cada reprodutor foi submetido a quinze colheitas de sêmen. Inicialmente, o prepúcio  
5 dos reprodutores foi devidamente higienizado, a fim de remover as impurezas com o auxílio de  
6 solução fisiológica a 0,9% e papel toalha. As colheitas foram realizadas pelo método de vagina  
7 artificial, específica para pequenos ruminantes, aquecida a uma temperatura de 38°C acoplada  
8 a um tubo coletor graduado tipo Falcon (CBRA 2013). Uma cabra em estro induzido foi  
9 utilizada como manequim, com a aplicação de 1 mL de ECP (cipionato de estradiol) por via  
10 intramuscular, semanalmente, durante o período de colheitas. Após cada colheita, os  
11 ejaculados, foi protegido da incidência direta de luz solar, transportado ao laboratório e mantido  
12 em banho Maria a 37 °C (CBRA 2013 e Qin et al., 2018).

13 Seguidamente, foram realizadas as avaliações subjetivas macroscópicas do ejaculado:  
14 volume, cor e aspecto. Procedeu-se, sequencialmente, as avaliações dos parâmetros  
15 espermáticos: turbilhonamento, motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática  
16 (CBRA 2013).

17 Foi utilizado um microscópio óptico (aumento de 400x) para avaliar a motilidade total  
18 (MT; escala de 0-100%) e vigor espermático (0-5), sendo depositada uma gota de sêmen entre  
19 lâmina e lamínula previamente aquecidas e mantidas a 37 °C. Para a realização da análise  
20 morfológica das células espermáticas foram contados 200 espermatozoides por lâmina corada  
21 em panótico rápido, em microscópio óptico, no aumento de 400x (CBRA 2013).

22 Para determinação da concentração espermática, o sêmen foi diluído em solução formol-  
23 salina (1: 200), e a contagem realizada em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio  
24 no aumento de 400x (CBRA 2013; Qin et al., 2018).

#### 25 2.5. Grupos experimentais

26 Os ejaculados colhidos foram reunidos em um *pool* e a concentração espermática foi  
27 avaliada em câmara de Neubauer. A taxa de diluição foi ajustada para uma concentração final  
28 de 320 milhões de espermatozoides/mL.

29 O *pool* seminal foi dividido em doze alíquotas de igual volume, com no mínimo cinco  
30 mililitros de sêmen cada uma e diluídas em dois diferentes meios diluentes para a  
31 criopreservação, TRIS e ACP®. Para todos os grupos experimentais (controle e experimentais),  
32 foram adicionados 40mg de gentamicina aos respectivos diluidores seminais. Seguidamente,  
33 foram formados os seguintes grupos: dois grupos controles (CG), contendo, ambos, adição da  
34 gema de ovo de galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) GC1 –TRIS 2,5%GOGD e GC2

1 – ACP<sup>®</sup> 2,5% GOGD . Um total de dez grupos experimentais GE, contendo adição em diferentes  
2 concentrações da gema de ovo de galinha d'Angola (*Numida meleagris*) – TRIS 2,5% GONM;  
3 TRIS 5% GONM; TRIS 10% GONM; TRIS 15% GONM; TRIS 20% GONM; ACP<sup>®</sup> 2,5%  
4 GONM; ACP<sup>®</sup> 5% GONM; ACP<sup>®</sup> 10% GONM; ACP<sup>®</sup> 15% GONM; ACP<sup>®</sup> 20% GONM.

#### 5 2.6. Congelamento/descongelamento de sêmen

6 Para cada grupo, foram envasadas oito palhetas francesas de 0,25 mL (IMV  
7 Technologies, Campinas, São Paulo, Brasil).

8 O processo de criopreservação foi realizado com auxílio do aparelho automatizado  
9 TK3000<sup>®</sup> (TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, Brasil), seguindo-se as instruções  
10 do fabricante, utilizando a curva rápida de congelamento (0,5 °C/min. até 5 °C; 15 °C/min. até -  
11 20 °C e 10 °C/min. até -120 °C). Posteriormente, as amostras foram imersas em nitrogênio  
12 líquido (-196 °C) e armazenadas em raques devidamente identificadas em botijões criogênicos.

#### 13 2.7. Análise da cinética espermática após descongelamento

14 A análise dos parâmetros da cinética espermática pós-descongelamento foram realizadas  
15 no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), do Núcleo Integrado de  
16 Biotecnologia (NIB), da Faculdade de Veterinária (FAVET), da Universidade Estadual do  
17 Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil, por meio do sistema CASA (Computer-assisted Sperm  
18 Analyser), utilizando o Software Sperm Class Analyser<sup>®</sup> (SCA) (Microptics, SL, versão 3.2.0,  
19 Barcelona, Espanha).

20 Após o período mínimo de sete dias, as amostras foram descongeladas em banho maria  
21 a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos tipo Eppendorf e homogeneizadas  
22 para a análise imediata (Arangsam et al., 2018)

23 Para proceder as análises das amostras criopreservadas em meio contendo TRIS/gema,  
24 uma amostra de 10 µL de sêmen descongelada foi rediluída em 50 µL de meio TRIS [3,786 g  
25 de Tris (hidroximetil) aminometano; 2,11 g de ácido cítrico; 1,0 g de frutose; 100 mL de água  
26 destilada] previamente aquecido em banho maria a 37 °C. Já as amostras criopreservadas em  
27 meio à base de ACP-101c<sup>®</sup>, uma amostra de 10 µL de sêmen descongelado foi rediluída em 50  
28 µL de meio ACP-101c<sup>®</sup> (3,25 g; 50 mL de água destilada).

29 Em seguida, 10 µL dessas diluições finais foram depositadas em câmara de *Makler* (Sefi  
30 Medical Instruments Ltda., Haifa, Israel), previamente aquecida a 37 °C e avaliado com auxílio  
31 de microscópio de contraste de fase acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema  
32 (Nikon<sup>™</sup> H5505, Eclipse 50i, Japão).

33 Foram utilizados os parâmetros específicos do programa: velocidade limite para  
34 espermatozoides lentos: 30 µm/s; limite para velocidade média: 60 µm/s; retilinearidade

1 mínima para espermatozoides progressivos: 80%, capturados em três campos. Foram avaliados  
2 200 espermatozoides pelo sistema CASA em cada amostra.

3 Os parâmetros avaliados incluíram: motilidade total (MT - %), motilidade progressiva  
4 (MP - %), velocidade curvilínea (VCL -  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média da trajetória (VAP -  $\mu\text{m/s}$ ),  
5 velocidade linear (VSL -  $\mu\text{m/s}$ ), linearidade (LIN - %), amplitude do deslocamento lateral da  
6 cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ), índice de oscilação ou retilinearidade (STR - %) e frequência do batimento  
7 cruzado (BCF - Hz) individual para cada célula espermática.

## 8 2.8. Análise de imunofluorescência após descongelação

### 9 2.8.1. Análise da integridade do acrossoma

10 Para a análise da integridade do acrossoma foi utilizada a sonda isocianato de  
11 fluoresceína conjugada (FITC-PNA; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA). Os  
12 espermatozoides foram classificados como portadores de acrossomas íntegros (AI), quando a  
13 região acrossomal apresentou fluorescência verde intensa. Foram considerados acrossoma não-  
14 íntegro quando não apresentaram coloração verde ou a fluorescência verde se restringiu apenas  
15 à região equatorial da cabeça espermática, de acordo com a técnica já descrita (Roth et al.,  
16 1998).

### 17 2.8.2. Análise da integridade da membrana plasmática

18 A análise da integridade da membrana plasmática (IMP) foi realizada com o uso da  
19 associação de duas sondas fluorescentes: Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma-  
20 Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) (0,46 mg/ml em PBS) e Iodeto de Propídio (IP; Sigma-  
21 Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) (0,5 mg/ml em PBS). Após o preparo da lâmina com os  
22 marcadores fluorescentes, os espermatozoides foram avaliados em microscópio de  
23 fluorescência em sala com iluminação controlada (aumento de 100x). Foram avaliados 100  
24 espermatozoides em microscópio de fluorescência, os quais foram classificados como íntegros,  
25 quando a cabeça do espermatozoide se encontrava com a coloração verde, e lesados, quando  
26 observado uma coloração vermelha (Harrison et al., 1990).

### 27 2.8.3. Análise da atividade mitocondrial

28 Para a determinação da atividade mitocondrial realizou-se a técnica proposta por  
29 (Guthrie et al., 2006) utilizando a sonda de Fluorocromo catiônico lipofílico (JC-1; Sigma-  
30 Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA). As células coradas em laranja foram classificadas com alto  
31 potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas  
32 com baixo potencial de membrana.

## 33 2.9. Análise estatística

1 Foram obtidas as médias e desvio-padrão e procedida à análise de variância (ANOVA)  
2 seguida pelo teste PLSD de Fisher para os parâmetros espermáticos motilidade, morfologia,  
3 análises de viabilidade espermáticas, utilizando sondas fluorescentes e a cinética espermática  
4 (CASA); e pelo teste de Kruskal-Wallis para o parâmetro de vigor espermático.

5 Para a comparação das médias, foi utilizado o teste de Tukey, de acordo com o  
6 coeficiente de variação obtido, considerando um nível de significância de 5%. Foi utilizado o  
7 PROC GLM (General Linear Models) do Software SAS® (Statistical Analysis System) para  
8 Windows versão 9.0.

### 9 **3. Resultados**

#### 10 3.1. Avaliação bromatológica da gema de ovo de *Numida meleagris*

11 Antes da utilização da gema de ovo de galinha d'Angola, foi realizada a avaliação  
12 bromatológica da mesma, sendo possível identificar os parâmetros demonstrados na tabela 1.

#### 13 3.2. Avaliação subjetiva dos parâmetros espermáticos pós-diluição e pós-descongelamento

14 Quanto aos parâmetros macroscópicos e microscópicos avaliados no sêmen fresco,  
15 imediatamente após realização do *pool* seminal destacam-se: aspecto cremoso com uma média  
16 do volume total de colheita de  $5,63 \pm 1,64$  mL. Esse volume foi centrifugado para retirada do  
17 plasma seminal, obtendo um volume médio do sêmen de  $4,97 \pm 1,65$  mL. Os valores médios da  
18 motilidade após colheita foram de  $81,67 \pm 10,47$ , vigor médio de  $4,7 \pm 0,70$  e uma média do  
19 turbilhão de  $3,93 \pm 0,59$ .

20 Nos resultados de análise subjetiva da cinética espermática quanto ao parâmetro  
21 motilidade do sêmen fresco diluído em TRIS e ACP-101c® acrescidos da gema de ovo de *Galus*  
22 *galus domesticus* (grupos controle) e gema de ovo de *Numida meleagris* (grupos  
23 experimentais), foi possível observar que não houve diferença entre os grupos. Desta forma,  
24 demonstrado que a gema de ovo de *Numida meleagris* pode ser um crioprotetor externo  
25 favorável à preservação da viabilidade espermática.

26 A figura 1 mostra o percentual de motilidade do sêmen pós-diluição em comparação ao  
27 percentual de motilidade pós-descongelamento.

28 Quanto a comparação entre as diferentes concentrações da gema de ovo de *Numida*  
29 *meleagris* dos grupos experimentais e da gema de ovo de *Galus galus domesticus* do grupo  
30 controle (ACP® 2,5%) não foi observada diferença nos valores de motilidade em relação à  
31 origem da gema de ovo ( $P > 0,05$ ).

32 Os resultados da análise subjetiva quanto a cinética espermática pós-diluição e pós-  
33 descongelamento para o parâmetro vigor do sêmen caprino diluído em TRIS e ACP-101c®

1 acrescidos da gema de ovo de *Galus galus domesticus* (grupos controle) e gema de ovo de  
2 *Numida meleagris* (grupos experimentais) estão descritos na tabela 2.

3 Na análise subjetiva do vigor espermático pós-descongelação houve diferença  
4 significativa entre os diluentes dos tratamentos com 5%, 15% e 20% da gema de ovo de *Numida*  
5 *meleagris* (ACP® 2,5%;  $P < 0,05$ ). Nos tratamentos com TRIS pós-descongelação, verificou-se  
6 diferença estatística nos diluentes dos tratamentos 2,5% e 10% da gema de ovo de *Numida*  
7 *meleagris* (TRIS 2,5%;  $P < 0,05$ ). Os grupos TRIS 15% e 20% com gema de ovo de *Numida*  
8 *meleagris* apresentaram os menores percentuais de vigor comparado ao grupo controle (TRIS  
9 2,5% gema de ovo de *Galus galus domesticus*) e aos demais grupos experimentais (TRIS 2,5;  
10 5,0 e 10,0% gema de ovo de *Numida meleagris*) ( $P < 0,05$ ).

11 Quando o diluente ACP-101c® foi utilizado, não houve diferença estatística nos  
12 parâmetros espermáticos entre as origens das gemas de ovo (*Gallus gallus domesticus* – grupo  
13 controle vs. *Numida meleagris*) ( $P > 0,05$ ). No entanto, na avaliação do diluente TRIS foi  
14 observado uma queda no vigor dos grupos com 15% e 20% de gema de ovo de *Numida*  
15 *meleagris* ( $P < 0,05$ ), porém, os demais grupos experimentais não apresentaram diferença  
16 estatística em relação ao controle ( $P > 0,05$ ), podendo considerar que a origem da gema não foi  
17 o fator preponderante nesse quesito. O maior percentual de vigor pós-descongelação comparados  
18 aos grupos experimentais verificou nas concentrações grupos experimentais TRIS com 2,5% e  
19 10% e grupos experimentais ACP-101c® 15% (tabela 2).

### 20 3.3. Avaliação objetiva da cinética espermática pós-descongelação

21 No presente estudo, além da análise subjetiva, utilizou-se o sistema de análise de sêmen  
22 auxiliado por computador (CASA), uma vez que possibilita uma avaliação objetiva e precisa  
23 dos parâmetros espermáticos (MT, LIN, VAP, VSL, VCL, STR e OSC).

24 Na tabela 3, foi possível observar o efeito da criopreservação espermática sobre o sêmen  
25 caprino criopreservado em meio ACP-101c® em diferentes concentrações da gema de ovo de  
26 *Numida meleagris* (GONM) e gema de ovo de *Galus galus domesticus* (GOGD).

27 Os resultados obtidos quanto ao sêmen criopreservado com 2,5%, 10%, 15% e 20% de  
28 GONM foram semelhantes ao grupo controle no parâmetro de motilidade total (MT). No  
29 entanto, o grupo experimental, 5% de GONM apresentou resultados inferiores aos do grupo  
30 controle nos parâmetros de motilidade. O grupo experimental, 15% de GONM apresentou maior  
31 porcentagens de motilidade. No parâmetro VCL não foi observada diferença significativa entre  
32 os grupos experimentais e grupo controle, obtendo maior velocidade na concentração de 20%.  
33 Na VSL a concentração de 10% de GONM possibilitou resultados superiores quando  
34 comparado aos demais grupos. Já para a VAP o grupo controle não diferiu dos demais

1 tratamentos. Porém, os grupos contendo as concentrações de 15% e 20% de GONM  
2 demonstraram resultados superiores encontrado na concentração de 2,5%.

3 Na tabela 4, pode-se observar o efeito da criopreservação espermática do sêmen caprino  
4 em meio TRIS e diferentes concentrações de GONM e de GOGD, por meio do sistema de  
5 análise computadorizada.

6 Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais  
7 e grupo controle para os parâmetros MT, VSL e VAP. Já para o parâmetro VCL, as  
8 concentrações de 15% e 20% de GONM proporcionaram melhores resultados. A concentração  
9 de motilidade do grupo experimental 20% em TRIS foi maior que a concentração do grupo  
10 controle TRIS.

11 Na tabela 5 observam-se os efeitos da criopreservação espermática no sêmen caprino  
12 criopreservado em meio ACP-101c<sup>®</sup> em diferentes concentrações de GONM e GOGD, por  
13 meio do sistema de análise computadorizada, para os parâmetros LIN, STR e OSC.

14 O sêmen criopreservado em meio contendo ACP-101c<sup>®</sup> nas concentrações de 2,5%, 5%,  
15 10%, 15% e 20% de GONM proporcionaram bons resultados nos parâmetros LIN, STR e OSC,  
16 não diferindo do grupo controle ( $P > 0,05$ ). O grupo experimental 20% obteve maior LIN do  
17 grupo experimento em comparação ou grupo controle contendo ACP-101c<sup>®</sup> 2,5%. No entanto,  
18 houve diferença significativa entre os grupos 2,5% e 15% com GONM ( $P < 0,05$ ).

19 Na tabela 6 é possível observar o efeito da criopreservação espermática no sêmen  
20 caprino criopreservado em TRIS e diferentes concentrações de GONM e de GOGD (grupo  
21 controle), por meio do sistema de análise computadorizada, para os parâmetros LIN, STR e  
22 OSC. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos contendo diferentes  
23 concentrações de GONM e o grupo controle ( $P > 0,05$ ).

24 Após a descongelação, a MT avaliada pelo sistema CASA apresentou-se semelhante ( $P$   
25  $> 0,05$ ) em todos os grupos testados, não havendo, portanto, efeito da concentração de GONM  
26 em ambos diluentes testados. O mesmo foi observado para os parâmetros VSL, VAP, STR e  
27 OSC. A VCL foi superior com o uso de 20% de GONM no diluente ACP-101c<sup>®</sup> e TRIS somente  
28 em comparação ao uso de 15% deste protetor ( $P < 0,05$ ), contudo esses grupos não diferiram  
29 dos demais ( $P > 0,05$ ).

30 Nos grupos utilizando ACP-101c<sup>®</sup> como diluente, verificou-se que a LIN foi inferior  
31 com o uso de 2,5% de GONM somente em comparação ao uso de 15% de GONM ( $P < 0,05$ ).  
32 Já nos grupos utilizando TRIS como diluente, o uso de 20% de GONM proporcionou maior  
33 percentual de LIN quando comparado somente ao grupo controle utilizando GOGD ( $P < 0,05$ ).

### 3.4. Análise da viabilidade espermática pós-descongelamento através da técnica de imunofluorescência

Os dados referentes às análises da viabilidade espermática, utilizando sondas fluorescentes em sêmen caprino criopreservados em diluente ACP-101c<sup>®</sup> e TRIS, estão descritos na tabela 7. Nesta tabela pode-se observar que não houve diferença entre os grupos experimentais e grupo controle ( $P > 0,05$ ).

Na análise de sondas fluorescentes, não foram observadas diferenças entre o grupo controle e os grupos experimentais quanto à origem e a concentração da gema de ovo quando o diluente ACP-101c<sup>®</sup> foi utilizado na criopreservação do sêmen caprino ( $P > 0,05$ ), resultando em membranas plasmáticas íntegras, alta atividade mitocondrial e acrossomas íntegros (tabela 7).

No teste de coloração fluorescente (membrana íntegra, atividade mitocondrial e acrossoma íntegro) não foi encontrada diferenças entre o grupo controle e os grupos experimentais quando o diluente TRIS foi utilizado com diferentes porcentagens de GONM (2,5%; 5,0%; 10,0%; 15,0%; e 20,0%) ( $P > 0,05$ ) (tabela 7).

Após a descongelamento espermática, foi verificado que a integridade de membrana plasmática e acrossoma, avaliados por microscopia de fluorescência, foram preservadas igualmente em todos os grupos testados neste estudo. O mesmo foi verificado para a atividade mitocondrial dos espermatozoides em todos os grupos pós-descongelamento.

Diante dos resultados de viabilidade espermática avaliados por fluorescência pode-se inferir que a GONM possui qualidades que a torna satisfatória para o processo de criopreservação do sêmen caprino. Na tabela 7, podemos observar que não houve diferença entre os grupos experimentais e grupo controle ( $P > 0,05$ ).

### 3.5. Avaliação morfológica das células espermáticas pós-descongelamento

Os resultados referentes à análise da morfologia espermática do sêmen criopreservado em ACP-101c<sup>®</sup> e TRIS adicionado de diferentes concentrações de GONM, podem ser observados na tabela 8. Nesta tabela estão os percentuais de espermatozoides com morfologia normal, aqueles com defeitos maiores, defeitos menores e com defeitos totais.

De acordo com os resultados obtidos, tanto os grupos controles como os grupos experimentais preservaram a morfologia dos espermatozoides no processo de congelamento-descongelamento quando o diluente TRIS e ACP-101c<sup>®</sup> foi utilizado ( $P > 0,05$ ).

## 4. Discussão

O pH encontrado (6,99) favorece a sobrevivência espermática (Purdy, 2006). Os teores de umidade e cinza foram semelhantes entre a GONM e a GOGD (Bashir et al., 2015).

1 O teor lipídico da GONM (34,56%) é maior do que o da GOGD, podendo induzir a uma  
2 maior ação protetora da membrana espermática durante o processo de  
3 congelação/descongelação (Watson et al.,1995).

4 Em relação à análise bromatológica da gema do ovo, ainda há uma escassez de  
5 informações acerca das qualidades nutricionais dos ovos de aves domésticas e selvagens (Bashir  
6 et al., 2015). Estudos a respeito da composição de ovos de *Gallus gallus domesticus* são bem  
7 descritos na literatura (Bashir et al., 2015). No entanto, tais informações não são bem descritas  
8 para outras espécies de aves, incluindo a *Numida meleagris*.

9 De acordo com a literatura (Bashir et al., 2015) foi avaliada a composição da gema de  
10 ovo de três espécies diferentes *Gallus gallus domesticus*, *Numida meleagris* e *Gallus gallus*  
11 *hibrido* não observaram diferença significativa no teor de proteína (3,34; 4,40 e 3,85%) e  
12 gordura (27,65; 31,49 e 30,41), respectivamente. No entanto, os resultados para esses dois  
13 parâmetros, neste estudo, foram superiores (9,37% e 34,56%, respectivamente) aos relatados  
14 pelos autores supracitados. Todavia, foram semelhantes aos valores encontrados em outro  
15 estudo (Adeyeye 2010), pois observaram 15,74% de teor de proteína e 31,91% de gorduras.

16 Vale inferir que apesar do risco de transmissão de doenças de origem animal a gema de  
17 ovo acrescida aos diluentes seminais (Silva et al., 2017), ainda continua sendo o crioprotetor  
18 extracelular de eleição na criopreservação de sêmen de ruminantes (Anand et al., 2017;  
19 Narwade et al., 2017).

20 Vários estudos vêm demonstrando resultados satisfatórios quanto da substituição da  
21 gema de ovo de *Galus galus domesticus* pela gema de ovo de outras espécies de aves, como,  
22 por exemplo, a de *Alectoris chukar* (Perdiz), a qual favoreceu uma melhora na motilidade total  
23 e motilidade progressiva (Humes et al., 2006) a de *Anas platyrhynchos domesticus* (Pata), que  
24 favoreceu um aumento na motilidade e redução de defeitos espermáticos (Andrabi et al., 2008),  
25 e a de *Rhea americana* (Ema), que demonstrou ser uma alternativa viável no incremento da  
26 qualidade do sêmen pós-descongelação. Contudo, até o momento, estudos avaliando a eficácia  
27 da gema de ovo de *Numida meleagris* na criopreservação de sêmen caprino ainda eram  
28 inexistentes, sendo este trabalho o pioneiro.

29 Os valores de motilidade deste estudo foram similares aos observados por outros autores  
30 (CBRA 2013) quando utilizaram o leite desnatado e TRIS como diluentes-base, adicionados de  
31 20% de gema de ovo de *Galus galus domesticus*, na criopreservação de sêmen caprino.

32 Os resultados de motilidade espermática aos cinco minutos pós-descongelação,  
33 quantificados no presente estudo, foram semelhantes aos obtidos por outros autores que



1 criopreservaram sêmen caprino em diluentes à base de TRIS com gema de ovo de *Galus galus*  
2 *domesticus* (Amidi et al., 2010; Hidalgo et al., 2006).

3 Na espécie caprina, vários estudos relatam valores baixos de motilidade progressiva  
4 pós-descongelção: 10,9% em caprinos nativos (Silva, 2017); 22 e 6% (Câmara et al., 2019).  
5 Esse é um parâmetro espermático de grande importância na escolha de reprodutores e também  
6 na avaliação de protocolos de congelação seminal (Câmara et al., 2019; Santiago-Moreno et al.,  
7 2017).

8 Estudos anteriores (Bispo et al., 2011) avaliaram por meio de testes *in vitro* e de  
9 fertilidade *in vivo*, quais concentrações de gema de ovo de *Galus galus domesticus* (baixa: 2,5%  
10 ou alta 20%) no diluente glicose-EDTA apresentavam melhor preservação do sêmen caprino  
11 congelado. Após a descongelção, o diluente com 2,5% de gema de ovo de *Galus galus*  
12 *domesticus* melhorou os parâmetros espermáticos pós-descongelção, independentemente da  
13 estação reprodutiva.

14 Os resultados do presente estudo sugerem que a substituição do crioprotetor gema de  
15 ovo de *Galus galus domesticus* (GOGD) por gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM)  
16 demonstra ser uma alternativa viável, visto que se mantêm os parâmetros espermáticos em  
17 níveis semelhantes aos relatados com o uso da gema de ovo de *Galus galus domesticus*.

18 A gema de ovo de *Gallus gallus domesticus* é um constituinte utilizado rotineiramente  
19 na criopreservação seminal de diversas espécies apresenta inúmeras vantagens, por conferir  
20 proteção aos espermatozoides contra o choque térmico provocado durante o processo de  
21 criopreservação (Layek et al., 2016; Oliveira et al., 2011). Nesse sentido, os resultados obtidos  
22 no presente estudo, indicam que a substituição da gema de ovo de *Gallus gallus domesticus* por  
23 gema de ovo de *Numida meleagris*, pode ser utilizada de forma satisfatória para essa finalidade.

24 Os percentuais de MT encontrados tanto nas amostras criopreservadas em TRIS como  
25 em ACP-101c<sup>®</sup>, nas diferentes concentrações de GONM, são inferiores aos encontrados na  
26 literatura (Oliveira et al., 2011), visto que utilizaram o diluente TRIS e obtiveram melhores  
27 resultados (MT = 54,5±16,5%; MP = 27,1±11,3%; VAP = 55,6±10,6 µm/s; e VSL = 47,9±10,5  
28 µm/s) quando comparado ao diluente ACP-101c<sup>®</sup>. Por outro lado, após incubação a 37 °C por  
29 cinco minutos, os parâmetros cinéticos dos espermatozoides criopreservados em meio ACP-  
30 101c<sup>®</sup> demonstraram a potencialidade deste diluente na congelação seminal de reprodutores  
31 caprinos.

32 A VCL e a VSL não ultrapassaram os 100 µm/s nos grupos experimentais. Nesse  
33 sentido, sabe-se que caso esse parâmetro ultrapasse os 250 µm/s, indicaria que houve uma  
34 hiperativação dos espermatozoides, e esta hiperativação é uma característica restrita, uma vez

1 que se trata da ativação espermática nas proximidades de onde ocorre a fertilização, isto é, no  
2 aparelho reprodutor feminino, especificamente na ampola da tuba uterina. Conforme descrito  
3 na literatura (Verstegen et al., 2002), essa ativação prematura reduzirá o tempo de vida útil dos  
4 espermatozoides, proporcionando uma menor chance de fecundação.

5 Em outros trabalhos utilizando ACP<sup>®</sup> como meio de criopreservação adicionado gema  
6 de ovo de galinha, também não foi encontrada diferença estatística quanto à qualidade seminal  
7 pós-descongelamento (Silva et al., 2017).

8 Em outros trabalhos utilizando ACP<sup>®</sup>, foi verificado que a integridade de membrana  
9 plasmática e acrossoma, avaliados por microscopia de fluorescência como meio de  
10 criopreservação adicionada de gema de ovo de galinha, também não foram encontradas  
11 diferenças estatísticas quanto à qualidade seminal pós-descongelamento (Silva 2005).

12 A gema de ovo é um importante componente de meios de refrigeração e congelamento  
13 para a proteção do sêmen de várias espécies, tendo sido suas propriedades descobertas desde  
14 1939 (Bathgat et al., 2006).

15 As principais alterações morfológicas pós-descongelamento encontradas foram  
16 relacionadas às alterações de cabeça e de cauda. Além disso, vale ressaltar que a maioria das  
17 alterações de cabeça observadas pós-descongelamento do sêmen concentravam-se no acrossoma.  
18 Resultados semelhantes a estes já foram relatados em vários estudos, os quais descreveram os  
19 efeitos deletérios da criopreservação sobre a porcentagem de anormalidades acrossomais em  
20 espermatozoides caprinos (Azerêdo et al., 2001; Ferrari et al., 1999; Hidalgo et al., 2006;  
21 Oliveira et al., 2011). Todavia, os percentuais de espermatozoides normais permaneceram  
22 dentro da normalidade para todos os grupos controles e experimentais, de acordo com a  
23 literatura (CBRA 2013).

## 24 **5. Conclusão**

25 A gema de ovo de *Numida meleagris*, como crioprotetor externo de membrana acrescida  
26 aos diluentes ACP-101c<sup>®</sup> e TRIS, melhora a qualidade do sêmen caprino, reduzindo as  
27 crioinjúrias provocadas durante o processo de congelamento-descongelamento. Nesse sentido, os  
28 diluentes apresentados acrescidos de gema de ovo de *Numina meleagris*, tornam-se novos  
29 produtos que podem ser utilizados na prática, visto por apresentarem ricos complexos  
30 lipoproteicos, tornando-se opções viáveis para seu uso em processos de criopreservação de  
31 sêmen de caprinos.

## 34 **Referências**

- 1 Adeyeye E. I. Characteristic composition of guinea fowl (*Numida Meleagris*) eGG,  
2 International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2010;1.
- 3 Alvarez-Suarez J.M., Sara T., Díaz D., Estevez Y. Romandini S., Giampieri F., Damiani E.,  
4 Astolfi P. , Bompadre S., Battino M., Antioxidant and antimicrobial capacity of several  
5 monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other  
6 chemical compounds. Food and Chemical Toxicology. 2011; 48: 2490-2499.
- 7 Amidi F., Farshad A., Khor A.K. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing  
8 step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of  
9 goat spermatozoa, Cryobiology. 2010; 61: 94-99.
- 10 Andrabi S.M.H., Ansari M.S., Ullah N., Anwar M., Mehmood A., Akhter S. Duck egg yolk in  
11 extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa, Animal Reproduction Science.  
12 2008; 104: 427-433.
- 13 Anand M., Baghel G., Yadav S. Effect of egg yolk concentration and washing on sperm quality  
14 following cryopreservation in barbari buck sêmen, Journal of Applied Animal Research. 2017;  
15 45: 560-565.
- 16 AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis, sixteenth  
17 edition, Arlington. 2006.
- 18 Arangasamy A.M., Venkata K., Manohar N., Selvaraju S., Guvvala P.R., Soren N.M., Reddy  
19 I.J., Roy K.S., Ravindra J.P. Advancement of puberty and enhancement of seminal  
20 characteristics by supplementation of trace minerals to bucks, Theriogenology. 2018; 110: 182-  
21 191.
- 22 Azerêdo G.A., Esper C.R., Resende K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen  
23 thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma, Small Ruminant Research. 2001; 41:  
24 257-263.
- 25 Bashir L., Ossai P.C., Shittu O.K., Abubakar A.N., Cale T. Comparison of the Nutritional Value  
26 of Egg Yolk and Egg Albumin from Domestic Chicken, Guinea Fowl and Hybrid Chicken,  
27 American Journal of Experimental Agriculture. 2015; 6: 310-316.
- 28 Bathgate R., Maxwell W. M. C., Evans G. 2006. Studies on the effect supplementing boar semen  
29 cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality.  
30 Reprod Domest Animal, 41, 68-73.
- 31 Bispo C.A.S., Pugliesi G., Palhão M.P., Coelho P.G.B., Ker P.G., Rodrigues M.T., Carvalho  
32 G.R. Características in vitro e fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5° C por 24 horas  
33 utilizando duas concentrações de gema de ovo no diluente, Ciência Animal Brasileira. 2011;  
34 12: 653-660.

- 1 Câmara T.S., Sousa Júnior A., Barçante F.P.S., Silva J.H.L., Sousa M.S., Machado A.A.C.,  
2 Salgueiro C.C.M., Montenegro A.R., Nunes J.F. Comparação da qualidade seminal de caprinos  
3 das raças Canindé e Alpina Britânica no Nordeste brasileiro, *Arquivo Brasileiro de Medicina*  
4 *Veterinária e Zootecnia*. 2019; 71: 1260-1268.
- 5 Cardoso R.C.S., Silva A.R., Uchoa D.C., Silva L. D. M. Cryopreservation of canine semen  
6 using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations.  
7 *Theriogenology*. 2003; 59: 743-751.
- 8 Carvalho J.M., Maia G.A., Sousa P.H.M., Junior G.A.M. Água de coco: propriedades  
9 nutricionais, funcionais e processamento. *Semina: Ciências Agrárias*. 2006; 27: 437-452.
- 10 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual de exame andrológico, segunda edição,  
11 Belo Horizonte, Brasil. 2013.
- 12 Dorado J., Rodríguez I., Hidalgo M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two  
13 freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial  
14 insemination, *Theriogenology*. 2007; 68: 168-177.
- 15 Ferrari S., Barnabe V.H. Effect of two kinds of diluents and two freezing methods on caprine  
16 semen quality, *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 1999; 36: 1-4.
- 17 Forouzanfar M., Sharafi M., Hosseini S.M., Ostadhosseini S., Hajian M., Hosseini L., Abedi  
18 P., Nili N., Rahmani H.R., Nasr-Esfahani M.H. In vitro comparison of egg yolk-based and  
19 soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 2010;  
20 73: 480-487.
- 21 Guthrie H.D., Welch G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high  
22 mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-  
23 activated flow cytometry, *J. Anim. Sci*. 2006; 84: 2089-2100.
- 24 Harrison R.A.P., Vickers S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in  
25 mammalian spermatozoa, *Jornal of Reproduction and Fertility*. 1990; 88: 343 -343.
- 26 Hidalgo M., Rodriguez I., Dorado J. Influence of staining and sampling procedures on goat  
27 sperm morphometric using the sperm class analyzer, *Theriogenology*. 2006; 66: 996-1003.
- 28 Hunes R., Webb G. Use of chichen or chukar egg yolk with two cryoprotectants for preservation  
29 of stallion sêmen, *Animal Reproduction Science*. 2006; 94: 62-63.
- 30 Layek S.S., Mohanty T.K., Kumaresan A., Parks J.E. Cryopreservation of bull semen:  
31 Evolution from egg yolk based to soybean based extenders, *Animal Reproduction Science*.  
32 2016; 172: 1-9.
- 33 Machado V.P., Nunes J.F., Araújo A.A., Fernández D.R.P., Cordeiro M.A., Medeiros C.H.N.,  
34 Medeiros A.L.N., Monteiro A.W.U. Fertilidade após inseminação artificial intra-cervical ou

- 1 laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. *Brazilian*  
2 *Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2006; 43: 43-49.
- 3 Narwade B.M., Mohanty T.K., Bhakat M., Rahim A. Goat semen Cryopreservation using egg  
4 yolk and soya based extenders containing trehalose, *Indian Journal of Animal Science*. 2017;  
5 87: 851-855.
- 6 Oliveira R.V., Nunes J. F., Salgueiro C.C.M., Cavalcante J.M.M., Brasil O.O., Moura A.A.A.N.  
7 Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó  
8 (ACP-101) ou TRIS, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online)*. 2011;  
9 6: 1295-1302.
- 10 Purdy P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Ressearch*. 2006; 63:  
11 215-225.
- 12 Qin Y., Yang S., Xu J., Xia C., Li X., An L., Tian J. Deep insemination with sex-sorted  
13 Cashmere goat sperm processed in the presence of antioxidants, *Reproduction in domestic*  
14 *animals*. 2018; 53: 11-19.
- 15 Roth T.L., Weiss R.B., Buff J.L., Bush L.M., Wildt D.E., Bush M. Heterologous in vitro  
16 fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned  
17 Oryx (*Oryx dammah*), *Biologia Reprodução*. 1998; 58: 475-482.
- 18 Rufino M.S.M., Alves R.E., Brito E.S., Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F., Mancini-Filho J.  
19 Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from  
20 Brazil, *Food Chemistry*. 2010; 121: 996-1002.
- 21 Salgueiro C.C.M., Mateos-Rex E., Sampaio N.J.C., Nunes J.F. Utilização de diferentes  
22 diluentes e métodos de congelamento do sêmen de bodes da raça Murciano-Granadina. *Revista*  
23 *Brasileira de Reprodução Animal (Impresso)*. 2003; 27: 625-630.
- 24 Salgueiro C.C.M., Nunes J.F., Oliveira K.P.L., Vieira V.E., Gondim J.M., Mareosrex E.  
25 Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó na inseminação artificial  
26 programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2002; 5: 96-98.
- 27 Santiago-Moreno J., Estes M.C., Castaño C., Toledano-Díaz A., Delgadillo J. A., López-  
28 Sebastián A. Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat  
29 sperm preservation compared with classical sperm washing, *Anim. Reprod. Sci*. 2017; 181:  
30 141-150.
- 31 Silva J.L. Efeito da época do ano sobre as características do sêmen criopreservado de caprinos  
32 Azul, Canindé e Moxotó nas estações seca e chuvosa. *Dissertação (Mestrado em Ciência*  
33 *Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2017; 57f.*

- 1 Silva A.R., Cardoso R.C.S., Silva L.D.M. Comparação entre a água de coco em pó (ACP) e o  
 2 Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães, Brazilian Journal of Veterinary  
 3 Research and Animal Science. 2006; 43: 767-774.
- 4 Silva A.R. Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional  
 5 e de suas interações com oócitos homólogos. 165f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)  
 6 – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza; 2005.
- 7 Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology  
 8 research and veterinary practice, Theriogenology. 2002; 57: 149-179.
- 9 Watt B., Merrill A.L. Composition of foods: raw, processed, prepared. Washington: Consumer  
 10 and Food Economics Research Division. 1963; 198.
- 11 Watson P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and  
 12 assessment of their post-thawing function, Reprod. Fertil. Dev. 1995; 7: 871-891.

13  
 14

Tabela 1

Composição química da gema de ovo de galinha d'Angola (*Numida meleagris*)

Parâmetros	Valores encontrados
Umidade (%)	51,84
Proteína bruta (%)	9,37
Atividade antioxidante (DPPH) $\mu\text{mol}/100\text{g}$	347,88
Cinza bruta (%)	1,94
pH	6,99
Carotenóides (mg/100g)	2.541,52
Betacaroteno (mg/100g)	52,37
Lipídios (%)	34,56
Carboidratos (mg/100g)	2,29
Valor energético (kcal/100g)	357,68

#: percentual. mg: miligramas. g: gramas. DPPH: 2,2- difenil-1-picril-hidrazil. kcal: quilocaloria.

15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28

Tabela 2

Médias ( $\pm$  d.p.) do parâmetro espermático (vigor) pós-diluição e pós-descongelamento do sêmen caprino em diferentes diluentes (TRIS e ACP-101c<sup>®</sup>) e em diferentes concentrações de gema de ovo das espécies *Gallus gallus domesticus* (GOGD) e *Numida meleagris* (GONM).

Grupos Experimentais	Pós-diluição Vigor (0-5)	Pós- descongelamento Vigor (0-5)
G.C2. ACP <sup>®</sup> GOGD 2,5%	4,03 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>	3,27 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>
G.E. ACP <sup>®</sup> GONM 2,5%	3,83 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	2,93 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>
G.E. ACP <sup>®</sup> GONM 5%	3,80 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	3,13 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>
G.E. ACP <sup>®</sup> GONM 10%	3,83 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	3,13 $\pm$ 0,92 <sup>b</sup>
G.E. ACP <sup>®</sup> GONM 15%	3,63 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>	3,27 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>
G.E. ACP <sup>®</sup> GONM 20%	3,60 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	3,20 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>
G.C1. TRIS GOGD 2,5%	3,87 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>	2,93 $\pm$ 0,70 <sup>b</sup>
G.E. TRIS GONM 2,5%	3,60 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	2,93 $\pm$ 0,88 <sup>b</sup>
G.E. TRIS GONM 5%	3,60 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>	2,87 $\pm$ 0,92 <sup>b</sup>
G.E. TRIS GONM 10%	3,43 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	2,93 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>
G.E. TRIS GONM 15%	3,63 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	2,60 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>
G.E. TRIS GONM 20%	3,63 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	2,80 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes entre colunas indicam diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ )

\*\*Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ( $P > 0,05$ ) entre linhas na mesma coluna

G.2.1 ACP<sup>®</sup>2,5% = Grupo controle contendo 2,5% de gema de ovo de *Gallus gallus domesticus*

G.E. ACP<sup>®</sup>2,5%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GOGD).

G.E. ACP<sup>®</sup>5,0%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. ACP<sup>®</sup>10%= Grupo experimental contendo 10% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. ACP<sup>®</sup>15%= Grupo experimental contendo 15% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. ACP<sup>®</sup>20%= Grupo experimental contendo 20% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.C1. TRIS 2,5% = Grupo controle contendo 2,5% de gema de ovo de *Gallus gallus domesticus* (GOGD).

G.E. TRIS 2,5%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 5,0%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 10%= Grupo experimental contendo 10% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 15%= Grupo experimental contendo 15% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 20%= Grupo experimental contendo 20% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

Tabela 3

Médias ( $\pm$  d.p.) dos parâmetros de cinética espermática (MT, VCL, VSL e VAP) do sêmen caprino criopreservado em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo de *Numida meleagris* avaliados pelo CASA pós-descongelção

Grupo Experimental	MT (%)	VCL( $\mu$ m/s)	VSL ( $\mu$ m/s)	VAP ( $\mu$ m/s)
GC2-ACP <sup>®</sup> 2,5%GOGD	21,39 $\pm$ 15,36 <sup>a</sup>	75,74 $\pm$ 14,14 <sup>a</sup>	57,90 $\pm$ 14,77 <sup>b</sup>	64,97 $\pm$ 15,32 <sup>ab</sup>
ACP <sup>®</sup> 2,5% GONM	16,25 $\pm$ 15,59 <sup>ba</sup>	71,71 $\pm$ 12,01 <sup>a</sup>	49,70 $\pm$ 12,35 <sup>b</sup>	58,33 $\pm$ 11,91 <sup>a</sup>
ACP <sup>®</sup> 5% GONM	12,95 $\pm$ 8,02 <sup>b</sup>	75,69 $\pm$ 15,20 <sup>a</sup>	56,68 $\pm$ 16,75 <sup>b</sup>	65,63 $\pm$ 17,34 <sup>ab</sup>
ACP <sup>®</sup> 10% GONM	17,91 $\pm$ 13,25 <sup>ab</sup>	67,92 $\pm$ 13,69 <sup>a</sup>	90,35 $\pm$ 14,25 <sup>a</sup>	61,75 $\pm$ 9,69 <sup>ab</sup>
ACP <sup>®</sup> 15% GONM	19,10 $\pm$ 16,48 <sup>ab</sup>	78,84 $\pm$ 9,46 <sup>a</sup>	60,54 $\pm$ 8,67 <sup>b</sup>	69,09 $\pm$ 9,37 <sup>b</sup>
ACP <sup>®</sup> 20% GONM	16,62 $\pm$ 16,61 <sup>ba</sup>	79,44 $\pm$ 14,97 <sup>a</sup>	60,19 $\pm$ 15,20 <sup>b</sup>	68,63 $\pm$ 14,80 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas (P<0,05).

MT = motilidade total; VCL = velocidade curvilinear; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média da trajetória.

GC2-ACP<sup>®</sup> 2,5%GOGD = ACP-101c<sup>®</sup> + 2,5% gema ovo *G. Gallus domesticus* (grupo controle); ACP<sup>®</sup> 2,5% GONM = ACP-101c<sup>®</sup> + 2,5% gema ovo *N. meleagris*; ACP<sup>®</sup> 5% GONM = ACP-101c<sup>®</sup> + 5% gema ovo *N. meleagris*; ACP<sup>®</sup> 10% GONM = ACP-101c<sup>®</sup> + 10% gema ovo *N. meleagris*; ACP<sup>®</sup> 15% GONM = ACP-101c<sup>®</sup> + 15% gema ovo *N. meleagris*; ACP<sup>®</sup> 20% GONM = ACP-101c<sup>®</sup> + 20% gema ovo *N. meleagris*.

1  
2  
3  
4

Tabela 4

Médias ( $\pm$  d.p.) dos parâmetros da cinética espermática (MT, VCL, VSL e VAP) do sêmen caprino criopreservado em TRIS adicionado de diferentes concentrações de GONM avaliados pelo CASA pós-descongelção

Grupo Experimental	MT (%)	VCL( $\mu$ m/s)	VSL ( $\mu$ m/s)	VAP ( $\mu$ m/s)
GC1-TRIS 2,5%GOGD	13,31 $\pm$ 11,96 <sup>a</sup>	56,06 $\pm$ 13,38 <sup>ab</sup>	35,35 $\pm$ 11,19 <sup>a</sup>	42,13 $\pm$ 12,70 <sup>a</sup>
TRIS 2,5% GONM	8,59 $\pm$ 6,10 <sup>a</sup>	58,91 $\pm$ 12,21 <sup>ab</sup>	35,05 $\pm$ 11,22 <sup>a</sup>	41,55 $\pm$ 11,71 <sup>a</sup>
TRIS 5% GONM	11,43 $\pm$ 11,0 <sup>a</sup>	58,93 $\pm$ 14,00 <sup>ab</sup>	35,27 $\pm$ 11,89 <sup>a</sup>	42,15 $\pm$ 12,94 <sup>a</sup>
TRIS 10% GONM	11,89 $\pm$ 8,03 <sup>a</sup>	64,69 $\pm$ 13,91 <sup>ab</sup>	35,29 $\pm$ 12,31 <sup>a</sup>	47,45 $\pm$ 12,29 <sup>a</sup>
TRIS 15% GONM	12,25 $\pm$ 8,94 <sup>a</sup>	67,37 $\pm$ 8,51 <sup>a</sup>	38,92 $\pm$ 10,63 <sup>a</sup>	48,03 $\pm$ 9,95 <sup>a</sup>
TRIS 20% GONM	17,61 $\pm$ 19,26 <sup>a</sup>	67,80 $\pm$ 12,70 <sup>a</sup>	37,41 $\pm$ 14,11 <sup>a</sup>	48,40 $\pm$ 12,19 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas (P<0,05).

MT = motilidade total; VCL = velocidade curvilinear; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média da trajetória.

GC1-TRIS 2,5%GOGD = TRIS + 2,5% gema ovo *G. Gallus domesticus* (grupo controle); TRIS 2,5% GONM = TRIS + 2,5% gema ovo *N. meleagris*; TRIS 5% GONM = TRIS + 5% gema ovo *N. meleagris*; TRIS 10% GONM = TRIS + 10% gema ovo *N. meleagris*; TRIS 15% GONM = TRIS + 15% gema ovo *N. meleagris*; TRIS 20% GONM = TRIS + 20% gema ovo *N. meleagris*.

5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13



Tabela 5

Médias ( $\pm$  d.p.) dos parâmetros da cinética espermática (LIN, STR e OSC) no sêmen caprino criopreservado em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações de GONM avaliados pelo CASA pós-descongelção

Grupo Experimental	LIN (%)	STR (%)	OSC (%)
GC2-ACP <sup>®</sup> 2,5%GOGD	73,92 $\pm$ 9,38 <sup>ab</sup>	86,31 $\pm$ 5,02 <sup>a</sup>	85,49 $\pm$ 6,97 <sup>a</sup>
ACP <sup>®</sup> 2,5% GONM	68,91 $\pm$ 10,76 <sup>a</sup>	84,47 $\pm$ 7,45 <sup>a</sup>	81,81 $\pm$ 7,05 <sup>a</sup>
ACP <sup>®</sup> 5% GONM	72,89 $\pm$ 9,54 <sup>ab</sup>	85,59 $\pm$ 5,02 <sup>a</sup>	85,15 $\pm$ 7,33 <sup>a</sup>
ACP <sup>®</sup> 10% GONM	73,89 $\pm$ 7,49 <sup>ab</sup>	84,54 $\pm$ 6,23 <sup>a</sup>	85,00 $\pm$ 5,37 <sup>a</sup>
ACP <sup>®</sup> 15% GONM	77,13 $\pm$ 7,83 <sup>b</sup>	87,64 $\pm$ 3,48 <sup>a</sup>	87,62 $\pm$ 6,21 <sup>a</sup>
ACP <sup>®</sup> 20% GONM	74,71 $\pm$ 11,95 <sup>ab</sup>	86,61 $\pm$ 6,58 <sup>a</sup>	85,69 $\pm$ 8,97 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas (P<0,05).

LIN = linearidade; STR = retilinearidade; OSC = índice de oscilação.

GC2-ACP<sup>®</sup> 2,5%GOGD = ACP-101c<sup>®</sup> + 2,5% gema ovo *G. Gallus domesticus* (grupo controle); ACP<sup>®</sup> 2,5% GONM = ACP-101c<sup>®</sup> + 2,5% gema ovo *N. meleagris*; ACP<sup>®</sup> 5% GONM = ACP-101c<sup>®</sup> + 5% gema ovo *N. meleagris*; ACP<sup>®</sup> 10% GONM = ACP-101c<sup>®</sup> + 10% gema ovo *N. meleagris*; ACP<sup>®</sup> 15% GONM = ACP-101c<sup>®</sup> + 15% gema ovo *N. meleagris*; ACP<sup>®</sup> 20% GONM = ACP-101c<sup>®</sup> + 20% gema ovo *N. meleagris*.

1

2

Tabela 6

Médias ( $\pm$  d.p.) dos parâmetros da cinética espermática (LIN, STR e OSC) no sêmen caprino criopreservado em TRIS adicionado de diferentes concentrações de GONM avaliados pelo CASA pós-descongelção

Grupo Experimental	LIN (%)	STR (%)	OSC (%)
GC1-TRIS 2,5%GOGD	73,92 $\pm$ 9,38 <sup>ab</sup>	86,31 $\pm$ 5,02 <sup>a</sup>	85,49 $\pm$ 6,97 <sup>a</sup>
TRIS 2,5% GONM	68,91 $\pm$ 10,76 <sup>a</sup>	84,47 $\pm$ 7,45 <sup>a</sup>	81,81 $\pm$ 7,05 <sup>a</sup>
TRIS 5% GONM	72,89 $\pm$ 9,54 <sup>ab</sup>	85,59 $\pm$ 5,02 <sup>a</sup>	85,15 $\pm$ 7,33 <sup>a</sup>
TRIS 10% GONM	73,89 $\pm$ 7,49 <sup>ab</sup>	84,54 $\pm$ 6,23 <sup>a</sup>	85,00 $\pm$ 5,37 <sup>a</sup>
TRIS 15% GONM	77,13 $\pm$ 7,83 <sup>b</sup>	87,64 $\pm$ 3,48 <sup>a</sup>	87,62 $\pm$ 6,21 <sup>a</sup>
TRIS 20% GONM	74,71 $\pm$ 11,95 <sup>ab</sup>	86,61 $\pm$ 6,58 <sup>a</sup>	85,69 $\pm$ 8,97 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas (P<0,05).

LIN = linearidade; STR = retilinearidade; OSC = índice de oscilação.

GC1-TRIS 2,5%GOGD = TRIS + 2,5% gema ovo *G. Gallus domesticus* (grupo controle); TRIS 2,5% GONM = TRIS + 2,5% gema ovo *N. meleagris*; TRIS 5% GONM = TRIS + 5% gema ovo *N. meleagris*; TRIS 10% GONM = TRIS + 10% gema ovo *N. meleagris*; TRIS 15% GONM = TRIS + 15% gema ovo *N. meleagris*; TRIS 20% GONM = TRIS + 20% gema ovo *N. meleagris*.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

Tabela 7

Médias ( $\pm$  d.p.) da integridade de membrana plasmática, atividade mitocondrial e integridade de acrossoma do sêmen caprino criopreservado em ACP-101c<sup>®</sup> e TRIS adicionado de diferentes concentrações de GONM avaliados por coloração fluorescente pós-descongelção

Grupo Experimental	Membrana Íntegra (%)	Atividade Mitocondrial (%)	Acrossoma Íntegro (%)
G.C.2 ACP <sup>®</sup> GOGD 2,5%	42,80 $\pm$ 17,94	34,40 $\pm$ 22,74	43,13 $\pm$ 16,73
G.E. ACP <sup>®</sup> GONM 2,5%	39,40 $\pm$ 24,09	37,67 $\pm$ 24,42	47,33 $\pm$ 21,00
G.E. ACP <sup>®</sup> GONM 5%	40,93 $\pm$ 17,54	43,27 $\pm$ 18,05	49,40 $\pm$ 20,72
G.E. ACP <sup>®</sup> GONM 10%	41,80 $\pm$ 21,23	36,47 $\pm$ 21,42	48,73 $\pm$ 24,05
G.E. ACP <sup>®</sup> GONM 15%	47,29 $\pm$ 24,48	47,36 $\pm$ 27,42	50,14 $\pm$ 16,26
G.E. ACP <sup>®</sup> GONM 20%	44,60 $\pm$ 22,03	35,20 $\pm$ 20,18	47,00 $\pm$ 26,10
G.C.1 TRIS GOGD 2,5%	39,57 $\pm$ 15,61	32,21 $\pm$ 14,68	45,86 $\pm$ 19,87
G.E. TRIS GONM 2,5%	43,40 $\pm$ 21,98	29,60 $\pm$ 21,06	54,07 $\pm$ 19,27
G.E. TRIS GONM 5%	40,33 $\pm$ 16,11	38,73 $\pm$ 16,87	53,73 $\pm$ 23,06
G.E. TRIS GONM 10%	40,53 $\pm$ 23,01	50,07 $\pm$ 25,80	51,00 $\pm$ 12,99
G.E. TRIS GONM 15%	38,53 $\pm$ 20,88	40,27 $\pm$ 22,00	47,13 $\pm$ 11,58
G.E. TRIS GONM 20%	45,87 $\pm$ 22,27	44,60 $\pm$ 23,73	51,87 $\pm$ 27,65

\*Letras diferentes entre colunas indicam diferenças estatísticas significativas (P<0,05)

\*\*Não foram observadas diferenças estatísticas significativas (P>0,05) entre linhas na mesma coluna

G.C.2. ACP<sup>®</sup>2,5% = Grupo controle contendo 2,5% de gema de ovo de *Gallus gallus domesticus*

G.E. ACP<sup>®</sup>2,5%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GOGD).

G.E. ACP<sup>®</sup>5,0%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. ACP<sup>®</sup>10%= Grupo experimental contendo 10% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. ACP<sup>®</sup>15%= Grupo experimental contendo 15% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. ACP<sup>®</sup>20%= Grupo experimental contendo 20% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.C.1 TRIS 2,5% = Grupo controle contendo 2,5% de gema de ovo de *Gallus gallus domesticus* (GOGD).

G.E. TRIS 2,5%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 5,0%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 10%= Grupo experimental contendo 10% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 15%= Grupo experimental contendo 15% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 20%= Grupo experimental contendo 20% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

Tabela 8

Médias ( $\pm$  desvio padrão) da morfologia de espermatozoides caprinos criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações de GONM avaliados pós-descongelamento

Grupo Experimental	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Totais (%)	Espermatozoides Normais (%)
GC2-ACP <sup>®</sup> 2,5%GOGD	2,20 $\pm$ 1,99	3,80 $\pm$ 1,58	6,00 $\pm$ 2,56	88,00 $\pm$ 5,11
ACP <sup>®</sup> 2,5% GONM	2,07 $\pm$ 2,06	2,83 $\pm$ 1,60	4,90 $\pm$ 3,31	90,20 $\pm$ 6,61
ACP <sup>®</sup> 5% GONM	2,77 $\pm$ 2,58	5,30 $\pm$ 3,62	8,07 $\pm$ 4,90	83,87 $\pm$ 9,79
ACP <sup>®</sup> 10% GONM	2,03 $\pm$ 1,37	4,07 $\pm$ 1,71	6,10 $\pm$ 2,44	87,80 $\pm$ 4,87
ACP <sup>®</sup> 15% GONM	1,77 $\pm$ 1,53	3,47 $\pm$ 1,63	5,23 $\pm$ 1,94	89,53 $\pm$ 3,87
ACP <sup>®</sup> 20% GONM	1,57 $\pm$ 1,00	3,50 $\pm$ 1,76	5,07 $\pm$ 1,36	89,87 $\pm$ 2,72
GC1 TRIS GOGD 2,5%	2,30 $\pm$ 1,75	2,47 $\pm$ 1,48	4,77 $\pm$ 2,10	90,47 $\pm$ 4,19
G.E. TRIS GONM 2,5%	2,13 $\pm$ 1,27	2,90 $\pm$ 1,56	5,03 $\pm$ 2,42	89,93 $\pm$ 4,83
G.E. TRIS GONM 5%	2,53 $\pm$ 2,37	3,10 $\pm$ 1,64	5,63 $\pm$ 2,90	88,73 $\pm$ 5,80
G.E. TRIS GONM 10%	2,43 $\pm$ 1,80	3,87 $\pm$ 2,47	6,30 $\pm$ 3,40	87,40 $\pm$ 6,80
G.E. TRIS GONM 15%	2,20 $\pm$ 2,16	4,33 $\pm$ 3,07	6,53 $\pm$ 3,73	86,93 $\pm$ 7,45
G.E. TRIS GONM 20%	1,60 $\pm$ 1,53	3,13 $\pm$ 2,47	4,73 $\pm$ 3,29	90,53 $\pm$ 6,59

\*Letras diferentes entre colunas indicam diferenças estatísticas significativas (P<0,05)

\*\*Não foram observadas diferenças estatísticas significativas (P>0,05) entre linhas na mesma coluna

G.C.2 ACP<sup>®</sup>2,5% = Grupo controle contendo 2,5% de gema de ovo de *Gallus gallus domesticus*

G.E. ACP<sup>®</sup>2,5%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GOGD).

G.E. ACP<sup>®</sup>5,0%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. ACP<sup>®</sup>10%= Grupo experimental contendo 10% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. ACP<sup>®</sup>15%= Grupo experimental contendo 15% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. ACP<sup>®</sup>20%= Grupo experimental contendo 20% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.C.1 TRIS 2,5% = Grupo controle contendo 2,5% de gema de ovo de *Gallus gallus domesticus* (GOGD).

G.E. TRIS 2,5%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 5,0%= Grupo experimental contendo 5,0% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

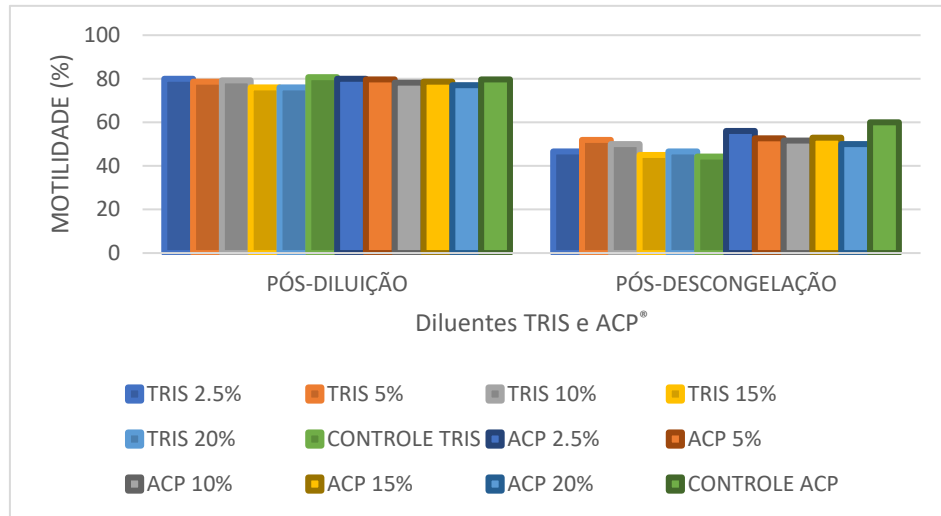
G.E. TRIS 10%= Grupo experimental contendo 10% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 15%= Grupo experimental contendo 15% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

G.E. TRIS 20%= Grupo experimental contendo 20% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

1 Figura 1.



15 Figura 1. Percentuais do parâmetro espermático (motilidade), análise subjetiva pós-diluição e

16 pós-descongelamento de sêmen caprino em diferentes diluentes (TRIS e ACP-101c®) e em

17 diferentes concentrações da gema de ovo das espécies *Gallus gallus domesticus* (GOGD) e

18 *Numida meleagris* (GONM).

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

1 **5. CAPITULO II**

2  
3  
4  
5  
6  
7 **Avaliação da viabilidade espermática de sêmen caprino**  
8 **criopreservado em meio ACP-101c e TRIS acrescido de gema de**  
9 **ovo de *Numida meleagris***

10 *(Evaluation of sperm viability of cryopreserved goat semen in ACP-*  
11 *101c and TRIS medium plus *Numida meleagris* egg yolk)*

12 *(Evaluación de la viabilidad espermática de semen de cabra criopreservado*  
13 *en medio ACP-101c y TRIS más yema de huevo *Numida meleagris*)*

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25 Periódico: *Research, Society and Development (A3)*  
26 (Publicado em 01/11/2021, versão em português)

27  
28  
29  
30  
31  
32 **Avaliação da viabilidade espermática de sêmen caprino criopreservado em meio ACP-**  
33 **101c e TRIS acrescido de gema de ovo de *Numida meleagris***

34 **Evaluation of sperm viability of cryopreserved goat semen in ACP-101c and TRIS**  
35 **medium plus *Numida meleagris* egg yolk**

36 **Evaluación de la viabilidad espermática de semen de cabra criopreservado en medio ACP-101c y**  
37 **TRIS más yema de huevo *Numida meleagris***

38  
39  
40 **Laércio Fontinele Bandeira de Macêdo**

41 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5417-3033>

42 Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará

43 E-mail: [laerciofbj@hotmail.com](mailto:laerciofbj@hotmail.com)

44 **Leticia Soares de Araújo Teixeira**

45 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1630-6904>

46 Universidade Federal do Piauí

- 1 E-mail: [leticiasoateixeira@gmail.com](mailto:leticiasoateixeira@gmail.com)  
2 **Wcleuden Matias Nascimento**  
3 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0264-2942>  
4 Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará  
5 E-mail: [wcleudemmatias@hotmail.com](mailto:wcleudemmatias@hotmail.com)  
6 **Clarissa de Castro e Braga**  
7 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2658-9111>  
8 Universidade Federal do Piauí  
9 E-mail: [clah\\_1995@hotmail.com](mailto:clah_1995@hotmail.com)  
10 **Kenney de Paiva Porfírio**  
11 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5195-0434>  
12 Universidade Federal do Piauí  
13 E-mail: [kenney@ufpi.edu.br](mailto:kenney@ufpi.edu.br)  
14 **Francisca Kelly dos Santos Silva**  
15 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2084-584x>  
16 Universidade Federal do Piauí  
17 E-mail: [fkelly2209@gmail.com](mailto:fkelly2209@gmail.com)  
18 **Sara Camila da Silveira Costa**  
19 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0381-0116>  
20 Universidade Federal do Piauí  
21 E-mail: [saracostapink@hotmail.com](mailto:saracostapink@hotmail.com)  
22 **Louis Henrique Miyauchi Silva**  
23 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5653-2263>  
24 Universidade Federal do Piauí  
25 E-mail: [louishms@hotmail.com.br](mailto:louishms@hotmail.com.br)  
26 **Rômulo José Vieira**  
27 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4154-3858>  
28 Universidade Federal do Piauí  
29 E-mail: [rvieirasb@yahoo.com.br](mailto:rvieirasb@yahoo.com.br)  
30 **Cristiane Clemente de Mello Salgueiro**  
31 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0071-4030>  
32 Universidade Estadual do Ceará  
33 E-mail: [cristiane.mello@uece.br](mailto:cristiane.mello@uece.br)  
34 **José Ferreira Nunes**  
35 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1189-0937>  
36 Universidade Estadual do Ceará  
37 E-mail: [nunesuece@gmail.com](mailto:nunesuece@gmail.com)  
38 **Nildene Silva Andradre Bandeira**  
39 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4723-8983>  
40 Faculdade Santo Agostinho –PI  
41 E-mail: [nildeneandrade@hotmail.com](mailto:nildeneandrade@hotmail.com)  
42 **Fabrcio Pires de Moura do Amara**  
43 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6187-2206>  
44 Universidade Estadual do Piauí  
45 E-mail: [fabrcio34amaral@gmail.com](mailto:fabrcio34amaral@gmail.com)  
46 **Janaina de Fátima Saraiva Cardoso**  
47 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4484-4403>  
48 Universidade Federal do Piauí  
49 E-mail: [janainadefatima@hotmail.com](mailto:janainadefatima@hotmail.com)  
50 **Ney Rômulo de Oliveira Paula**  
51 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0484-3748>  
52 Universidade Federal do Piauí  
53 E-mail: [neyromulo@ufpi.edu.br](mailto:neyromulo@ufpi.edu.br)  
54

## 55 **Resumo**

56 Um meio diluente ideal para a criopreservação seminal deve suprir as células espermáticas  
57 com energia, proteção e manutenção de um ambiente adequado à sua sobrevivência.  
58 Objetivou-se avaliar a integridade *in vitro* do sêmen caprino criopreservado em meio ACP-

1 101c<sup>®</sup> associado à gema de ovo de *Numida meleagris*, por meio de duas técnicas de análise  
2 individual da célula espermática. Foram colhidos 15 ejaculados de cinco caprinos, com  
3 auxílio de uma vagina artificial. Os ejaculados foram reunidos em um *pool*, e dividido em 12  
4 grupos, sendo dois grupos controles: GC1 TRIS, com adição 2,5% da gema de ovo de *Gallus*  
5 *gallus domesticus* GOGD, GC2 ACP-101c<sup>®</sup>, com adição 2,5% da gema de ovo de *Gallus*  
6 *gallus domesticus* GOGD e dez grupos experimentais GE, contendo a adição da gema de ovo  
7 de *Numida meleagris*. Seguidamente, as alíquotas foram envasadas em palhetas francesas de  
8 0,25 mL e congeladas com auxílio do aparelho TK3000<sup>®</sup> e armazenadas em nitrogênio  
9 líquido. Amostras foram descongeladas após sete dias e avaliadas quanto à integridade do  
10 DNA e quanto a sua ultraestrutura individual, por meio do teste cometa e microscopia  
11 eletrônica de transmissão, respectivamente. Nos resultados obtidos pelo teste cometa, não foi  
12 evidenciado diferença estatística quanto ao comprimento da cauda, entre os grupos TRIS  
13 acrescido de GONM, nas concentrações de 2,5%, 5% e 10% em relação ao grupo controle  
14 TRIS 2,5% de GOGD. Também não houve diferença estatística quanto ao percentual de  
15 fragmentação de DNA na cauda, nos grupos TRIS com 2,5%; 5%; e 20% de GONM em  
16 comparação ao grupo controle TRIS 2,5% GOGD (P>0,05). Os grupos ACP<sup>®</sup> com 10%, 15%  
17 e 20% de GONM apresentaram maior comprimento de cauda quando comparados aos grupos  
18 ACP com 2,5% e 5% de GONM e grupo controle (ACP<sup>®</sup> 2,5% de GOGD). Na análise  
19 ultraestrutural o grupo ACP<sup>®</sup> com 10% de GONM, destacou-se com melhor integridade  
20 celular frente aos demais grupos, inclusive, frente às amostras avaliadas do grupo controle.  
21 Dessa forma, conclui-se que a gema de ovo de *Numida meleagris*, como crioprotetor externo  
22 de membrana, acrescida aos diluentes ACP-101c<sup>®</sup> ou TRIS, pode reduzir os danos causados  
23 durante o processo de criopreservação do sêmen caprino.

24 **Palavras-chave:** Bode, Teste cometa, Microscopia eletrônica de transmissão, ACP<sup>®</sup>.

#### 25 **Abstract**

26 An ideal diluent medium for seminal cryopreservation must supply sperm cells with energy,  
27 protection and maintenance of an environment suitable for their survival. The objective of  
28 this study was to evaluate the in vitro integrity of goat semen cryopreserved in ACP-101c<sup>®</sup>  
29 medium associated with the egg yolk of *Numida meleagris*, through two techniques of  
30 individual sperm cell analysis. Fifteen ejaculates from five goats were collected with the aid  
31 of an artificial vagina. Ejaculates were collected in a *pool* and divided into 12 groups, two  
32 control groups: GC1 TRIS, with 2.5% addition of the egg yolk of *Gallus gallus domesticus*  
33 GOGD, GC2 ACP-101c<sup>®</sup>, with 2.5% addition from the egg yolk of *Gallus gallus domesticus*  
34 GOGD and ten experimental groups GE, containing the addition of the egg yolk of *Numida*  
35 *meleagris*. Afterwards, the aliquots were bottled in French 0.25 mL straws and frozen with  
36 the aid of the TK3000<sup>®</sup> device and stored in liquid nitrogen. Samples were thawed after seven  
37 days and evaluated for DNA integrity and for their individual ultrastructure, using the comet  
38 test and transmission electron microscopy, respectively. In the results obtained by the comet  
39 test, there was no statistical difference in tail length between the TRIS groups plus GONM,  
40 at concentrations of 2.5%, 5% and 10% compared to the control group TRIS 2.5 % of GOGD.

1 There was also no statistical difference regarding the percentage of DNA fragmentation in  
 2 the tail, in the TRIS groups with 2.5%; 5%; and 20% GONM compared to the TRIS control  
 3 group 2.5% GOGD ( $P>0.05$ ). The ACP<sup>®</sup> groups with 10%, 15% and 20% GONM had greater  
 4 tail length when compared to the ACP groups with 2.5% and 5% GONM and control group  
 5 (ACP 2.5% GOGD). In the ultrastructural analysis, the ACP<sup>®</sup> group with 10% GONM stood  
 6 out with better cellular integrity compared to the other groups, even compared to the  
 7 evaluated samples of the control group. Thus, it is concluded that the egg yolk of *Numida*  
 8 *meleagris*, as an external membrane cryoprotectant, added to ACP-101c<sup>®</sup> or TRIS extenders,  
 9 can reduce the damage caused during the process of cryopreservation of goat semen.

10 **Keywords:** billy-goat, Comet test, Transmission electron microscopy, ACP<sup>®</sup>.

### 11 **Resumen**

12 Un medio diluyente ideal para la criopreservación seminal debe proporcionar a los  
 13 espermatozoides energía, protección y mantenimiento de un entorno adecuado para la  
 14 supervivencia de los espermatozoides. El objetivo de este estudio fue evaluar la integridad in  
 15 vitro de semen de cabra criopreservado en medio ACP-101c<sup>®</sup> asociado a la yema de huevo  
 16 de *Numida meleagris*, mediante dos técnicas de análisis de espermatozoides individuales. Se  
 17 recolectaron quince eyaculados de cinco cabras con la ayuda de una vagina artificial. Los  
 18 eyaculados se recolectaron en un *pool* y se dividieron en 12 grupos, dos grupos de control:  
 19 GC1 TRIS, con adición al 2.5% de la yema de huevo de *Gallus gallus domesticus* GOGD,  
 20 GC2 ACP-101c<sup>®</sup>, con adición al 2.5% de la yema de huevo de *Gallus gallus domesticus*  
 21 GOGD y diez grupos experimentales GE, que contienen la adición de la yema de huevo de  
 22 *Numida meleagris*. Posteriormente, las alícuotas se llenaron en pajitas francesas de 0,25 mL  
 23 y se congelaron con la ayuda del dispositivo TK3000<sup>®</sup> y se almacenaron en nitrógeno líquido.  
 24 Las muestras se descongelaron después de siete días y se evaluó la integridad del ADN y su  
 25 ultraestructura individual, utilizando la prueba del cometa y la microscopía electrónica de  
 26 transmisión, respectivamente. En los resultados obtenidos por la prueba del cometa, no hubo  
 27 diferencia estadística en la longitud de la cola entre los grupos TRIS más GONM, a  
 28 concentraciones de 2.5%, 5% y 10% en comparación con el grupo control TRIS 2.5% de  
 29 GOGD. Tampoco hubo diferencia estadística con respecto al porcentaje de fragmentación  
 30 del ADN en la cola, en los grupos TRIS con 2.5%; 5%; y 20% de GONM en comparación  
 31 con el grupo de control de TRIS 2,5% de GOGD ( $P> 0,05$ ). Los grupos de ACP<sup>®</sup> con 10%,  
 32 15% y 20% de GONM tenían una mayor longitud de cola en comparación con los grupos de  
 33 ACP<sup>®</sup> con 2,5% y 5% de GONM y el grupo de control (ACP<sup>®</sup> 2,5% de GOGD). En el análisis  
 34 ultraestructural, el grupo ACP<sup>®</sup> con 10% de GONM se destacó con mejor integridad celular  
 35 en comparación con los otros grupos, incluso en comparación con las muestras evaluadas del  
 36 grupo control. Así, se concluye que la yema de huevo de *Numida meleagris*, como  
 37 crioprotector de membrana externa, agregado a los extensores ACP-101c<sup>®</sup> o TRIS, puede  
 38 reducir el daño causado durante el proceso de criopreservación de semen de cabra.

39 **Palabras clave:** Cabra, Ensayo de cometas, Microscopía electrónica de transmisión, ACP<sup>®</sup>.

### 40 **1. Introdução**



1           Dentre as biotecnologias aplicadas a reprodução animal, as biotécnicas aplicadas ao  
2 sêmen são as mais utilizadas principalmente, nas espécies: bovina, caprina e ovina. Uma vez  
3 que o sêmen é utilizado para a realização praticamente de todas as outras biotecnologias  
4 reprodutivas, como, por exemplo, a produção *in vitro* de embriões, produção *in vivo* de  
5 embriões, inseminação artificial e entre outras (Qin et al., 2018).

6           Nesse contexto, o sêmen vem sendo objetivo de estudo em muitos trabalhos  
7 científicos na área de reprodução animal. E, devido às pesquisas já realizadas ao longo do  
8 tempo, foram desenvolvidos inúmeros métodos para a avaliação do sêmen, a fim de testificar  
9 a viabilidade das células espermáticas, contribuindo para a eficiência das biotecnologias  
10 reprodutivas (Qin et al., 2018).

11           O teste cometa é um método de eletroforese em microgel para detecção e  
12 quantificação de fragmentações nas moléculas de DNA, em células individuais, usando  
13 microscopia e pH alcalino (pH > 13) (Park; Choi, 2007; Zaia, 2015). Devido as suas  
14 particularidades, o teste cometa vem sendo utilizado para avaliar a integridade do DNA de  
15 células espermáticas oriundas de sêmen animal criopreservado.

16           Ademais a microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta muito  
17 utilizada para determinar o tamanho e a forma das estruturas inorgânicas e biológicas baseada  
18 na interação dos elétrons incidentes sobre a matéria. É uma técnica de grande relevância  
19 devido à possibilidade de avaliação das estruturas da célula (organelas e membranas)  
20 espermática em uma escala muito reduzida, o que favorece a visualização de alterações não  
21 observadas nos testes comuns por meio da microscopia óptica (Silva; Guerra, 2011).

22           Além disso, vale ressaltar que a escolha de um bom meio diluente é essencial para  
23 conferir proteção às células espermáticas protegendo-as durante o processo de  
24 criopreservação, por isso, são constituídos de ingredientes básicos, como substratos  
25 energéticos, tampões e componentes contra danos criogênicos (Cavalcante et al., 2014). E,  
26 devido a isso, a determinação de meios diluentes mais eficazes e que contenham ingredientes  
27 mais selecionados, tem sido foco de muitas pesquisas científicas.

28           Dentre os meios diluentes já utilizados, pode-se citar a água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>),  
29 tris gema, tris glicose gema, leite desnatado e entre outros (Salgueiro et al., 2012). No entanto,  
30 ainda não há relatos na literatura sobre a elaboração de um meio diluente seminal a base de  
31 gema de ovo de *Numida meleagris*, fato este que impulsionou a realização deste estudo.  
32 Tendo em vista, colaborar com os trabalhos já realizados.

33           Nesse sentido, objetivou-se, por meio deste estudo, avaliar a integridade *in vitro* do  
34 sêmen caprino criopreservado em meio ACP-101c<sup>®</sup> e TRIS acrescidos de um componente  
35 orgânico ainda não utilizado, a gema de ovo de *Numida meleagris*, por meio de duas técnicas  
36 de análise individual da célula espermática.

## 37 **2. Material e métodos**

### 38 *2.1. Ética na pesquisa animal*

39           O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da  
40 Universidade Estadual do Piauí (CEUA/UESPI), sob o número de protocolo 07614/2018, em

1 20/07/2018. Para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei  
2 N° 11.794, de 08 de outubro de 2008, Decreto N° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as  
3 normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
4 (CONCEA).

### 5 2.2. Animais utilizados e local de realização do estudo

6 A pesquisa foi desenvolvida no setor de reprodução animal, da Universidade Federal  
7 do Piauí, *Campus* da Socopo, Teresina, Piauí, Brasil. Cujas coordenadas geográficas são: 5°  
8 03' 23,1'' de Latitude Sul e 42° 47' 27,9'' de Longitude Oeste, com altitude média de 72,7  
9 metros.

10 Foram utilizados cinco reprodutores da espécie caprina, raça Anglo Nubiana, puros  
11 de origem, com idade média de quatro anos, clinicamente saudáveis e com escore de condição  
12 corporal de 3,5 numa escala de (0-5). Os animais utilizados foram provenientes de uma  
13 fazenda localizada no município de Campo Maior, no Estado do Piauí, cujas coordenadas  
14 geográficas são: Latitude 4°51'35,75'' S e Longitude 42°12'47,18'' com altitude média de  
15 129 metros. Os animais recebiam na alimentação diária: volumoso (*Pennisetum purpureum*  
16 *Schum*), concentrado comercial (ração peletizada com teor de 20% proteína, 300  
17 g/animal/dia), sal mineral específico para a espécie caprina (Caprinofós®) e água a vontade.

18 Os reprodutores foram submetidos ao exame clínico reprodutivo, visando a  
19 avaliação da higidez geral e do aparelho reprodutivo, seguindo os critérios estabelecidos pelo  
20 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

### 21 2.3. Avaliação bromatológica da gema de ovo da galinha d'Angola (*Numida meleagris*)

22 Foram utilizados ovos de *Numida meleagris*, criadas em sistema extensivo, com  
23 postura em intervalo médio de cinco dias, provenientes de produtores rurais da microrregião  
24 de Campo Maior-PI. As aves recebiam como alimento sementes, insetos, grãos de milho e  
25 matéria seca de gramíneas nativas de capim mimoso (*Axonopus purpusii Chas*) e outras  
26 espécies *Mésosetum*, *Axonopus*, *Pás palum*, *Panicum* e *Eriochloqde*. Além disso, recebiam  
27 concentrados energéticos e proteicos de forma sólida em comedouros e disponibilidade de  
28 água *ad libitum*.

29 As análises bromatológicas foram realizadas na Universidade Federal do Piauí  
30 (UFPI), no Centro de Ciências da Saúde (CCS), Departamento de Nutrição, especificamente  
31 no Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos (LBROMBIOQ) e no  
32 Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Análise Sensorial de Alimentos (LASA).

33 Neste estudo, foram realizadas as seguintes análises bromatológicas: matéria seca,  
34 cinza, extrato estéreo, lipídio, carboidratos, proteínas e determinação de umidade.

35 O valor calórico do “nugget” em estudo foi calculado utilizando-se os fatores de  
36 conversão de ATWATER: 4 kcal/g para proteínas, 4 kcal/g para carboidratos e 9 kcal/g para  
37 lipídios (Watt e Merrill, 1963). Posteriormente, os teores de carotenoides totais foram  
38 determinados de acordo com a metodologia de Alvarez-Suarez et al. (2011), utilizando o  
39 solvente acetona/hexano e todos os extratos foram elaborados de acordo com a metodologia  
40 proposta por Rufino et al. (2010).

1 Por fim, a atividade antioxidante foi determinada pelo método de captura de radicais,  
2 utilizando o radical DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil).

#### 3 2.4. Colheita de sêmen e avaliação espermática

4 Cada reprodutor foi submetido a quinze colheitas de sêmen, com intervalos de  
5 quinze dias, para que tivessem um período de descanso após cada colheita. Inicialmente, o  
6 prepúcio dos reprodutores foi devidamente higienizado, a fim de remover as impurezas com  
7 o auxílio de solução fisiológica a 0,9% e papel toalha. As colheitas foram realizadas pelo  
8 método de vagina artificial, específica para pequenos ruminantes, aquecida a uma  
9 temperatura de 38°C acoplada a um tubo coletor graduado tipo Falcon (CBRA, 2013). Uma  
10 cabra em estro induzido foi utilizada durante as colheitas. Após cada colheita, o ejaculado foi  
11 protegido da incidência direta de luz solar, transportado ao laboratório e mantido em banho  
12 Maria a 37 °C (CBRA, 2013; Quin et al., 2018).

13 Seguidamente, foram realizadas as avaliações subjetivas macroscópicas do  
14 ejaculado, como, por exemplo, volume, cor e aspecto. Procedeu-se, sequencialmente, as  
15 avaliações dos parâmetros espermáticos, como: turbilhonamento, motilidade, vigor,  
16 morfologia espermática e concentração espermática (CBRA, 2013).

17 Foi utilizado um microscópio óptico (aumento de 400x) para avaliar a motilidade  
18 total (MT; escala de 0-100%) e vigor espermático (0-5), sendo depositada uma gota de sêmen  
19 entre lâmina e lamínula previamente aquecidas e mantidas a 37 °C. Na realização da análise  
20 morfológica das células espermáticas foram contados 200 espermatozoides por lâmina, em  
21 microscópio óptico, no aumento de 400x.

22 Para determinação da concentração espermática, o sêmen foi diluído em solução  
23 formol-salina (1: 200), e a contagem realizada em câmara de Neubauer com auxílio de um  
24 microscópio no aumento de 400x (CBRA, 2013; Quin et al., 2018).

#### 25 2.5. Formação dos grupos experimentais

26 Os ejaculados colhidos foram reunidos em um pool e a concentração espermática  
27 foi avaliada em câmara de Neubauer. A taxa de diluição foi ajustada para uma concentração  
28 final de 320 milhões de espermatozoides/mL.

29 O pool foi dividido em doze alíquotas de igual volume, com no mínimo cinco  
30 mililitros de sêmen e diluídas em dois meios diluentes para criopreservação, TRIS e ACP®.  
31 Seguidamente, foram formados os seguintes grupos: dois grupos controles (GC1 e GC2),  
32 contendo adição da gema de ovo de galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*), sendo o  
33 GC1 contendo TRIS 2,5% de gema de ovo de galinha doméstica (GOGD) e GC2 contendo  
34 ACP® 2,5% de gema de ovo de galinha doméstica (GOGD) (tabela 1). E um total de dez  
35 grupos experimentais distribuídos entre os dois meios diluentes de criopreservação – TRIS e  
36 ACP®, diferindo dos GC por conter a adição de um ingrediente nunca testado, a gema de ovo  
37 da galinha d'Angola (*Numida meleagris*). Vale ressaltar que os grupos experimentais foram  
38 divididos em dez concentrações distintas de gema de ovo de *Numida meleagris*, a saber: TRIS  
39 2,5% de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM); TRIS 5% de GONM; TRIS 10% de

1 GONM; TRIS 15% de GONM; TRIS 20% de GONM; ACP® 2,5% de GONM; ACP® 5%  
 2 de GONM; ACP® 10% de GONM; ACP® 15% de GONM; ACP® 20% de GONM (tabela 2).

**Tabela 1.** Descrição dos grupos controles.

<b>Grupos Controles</b>	<b>Concentrações/Descrição</b>
GC1 – TRIS + 2,5% GOGD	TRIS + 2,5% gema de ovo de <i>Galus gallus domesticus</i>
GC2 – ACP + 2,5% GOGD	ACP-101c + 2,5% gema de ovo de <i>Galus gallus domesticus</i>

ACP: água de coco em pó. TRIS: hidroximetil aminometano. GOGD: gema de ovo de *Galus gallus domesticus*. %: percentual.

3  
4  
5

**Tabela 2.** Descrição dos grupos experimentais

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Concentrações/Descrição</b>
TRIS 2,5% GONM	TRIS + 2,5% gema de ovo <i>Numida meleagris</i>
TRIS 5% GONM	TRIS + 5% gema de ovo <i>Numida meleagris</i>
TRIS 10% GONM	TRIS + 10% gema de ovo <i>Numida meleagris</i>
TRIS 15% GONM	TRIS + 15% gema de ovo <i>Numida meleagris</i>
TRIS 20% GONM	TRIS +20% gema de ovo <i>Numida meleagris</i>
ACP 2,5% GONM	ACP-101c + 2,5% gema de ovo <i>Numida meleagris</i>
ACP 5% GONM	ACP-101c + 5% gema de ovo <i>Numida meleagris</i>
ACP 10% GONM	ACP-101c + 10% gema de ovo <i>Numida meleagris</i>
ACP 15% GONM	ACP-101c + 15% gema de ovo <i>Numida meleagris</i>
ACP 20% GONM	ACP-101c + 20% gema de ovo <i>Numida meleagris</i>

ACP: água de coco em pó. TRIS: hidroximetil aminometano. GONM: gema de ovo de *Numida meleagris*. %: percentual.

6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

#### 2.6. Congelamento/descongelamento de sêmen

Foram envasadas oito palhetas francesas de 0,25 mL (IMV Technologies, Campinas, São Paulo, Brasil) de cada grupo.

O processo de criopreservação foi realizado com auxílio do aparelho TK3000® (TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante, utilizando a curva rápida (0,5 °C/min. até 5 °C; 15 °C/min. até -20 °C e 10 °C/min. até -120 °C). Posteriormente, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e, armazenadas em raques em botijões criogênicos.

#### 2.7. Avaliação da integridade do DNA pós-descongelamento

Após sete dias, procedeu-se a descongelamento do sêmen para a análise da integridade do DNA dos espermatozoides caprinos, através do teste Cometa (“OpenComet”). A análise da integridade do DNA foi realizada no Laboratório de Mutagenicidade (LABMUT) do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade (NPBio) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), Teresina, Piauí, Brasil.

1 As amostras de sêmen foram descongeladas e 5  $\mu$ L foram acondicionados em  
2 microtubos contendo 75  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37 °C.  
3 Posteriormente, essa mistura foi homogeneizada e transferida para lâminas pré-revestidas  
4 com agarose. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas e colocadas a 3 °C  
5 durante 20 min. Por fim, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em  
6 solução de lise por 48 horas.

7 Na sequência, as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese contendo uma  
8 solução tampão, para a desnaturação do DNA. Foi realizada a eletroforese e as lâminas foram  
9 neutralizadas e, em seguida, secas e armazenadas para análise posterior. Finalmente, as  
10 lâminas foram coradas com brometo de etídeo (20 mg/mL) e cobertas com uma lamínula.

11 A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência em  
12 um aumento de 40x, em ensaio cego. Posteriormente, foram contabilizadas 200 células por  
13 lâminas de cada concentração experimental (100 para cada exposição-aguda e crônica). As  
14 formas dos cometas seguiram um padrão estabelecido no laboratório. Foram utilizadas  
15 classes de 0 a 3, sendo 0 nenhum dano e três, cauda do cometa superior a duas vezes o  
16 tamanho do nucleóide. A partir destes dados, foi calculado o Índice de Danos e a Frequência  
17 de Danos, variando de 0 (ausência de danos) até 100 (dano máximo).

#### 18 *2.8. Avaliação ultraestrutural dos espermatozoides pós-descongelção*

19 A integridade morfológica das membranas e organelas dos espermatozoides pós-  
20 descongelção foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), no Instituto de  
21 Biociências da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brasil.

22 O protocolo utilizado foi o de Burgess et al. (2001), em que as palhetas de sêmen  
23 foram descongeladas a 37 °C e lavadas em PBS a 37 °C. Em seguida, foram centrifugadas a  
24 5.000 g e fixadas em glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,1M). Foram então pós-  
25 fixadas em tetróxido de ósmio em tampão fosfato, contrastadas em bloco com acetato de  
26 uranila (2,5%), submetidas à desidratação em séries crescente de acetona (30%, 50%, 70%,  
27 90% e 100%) por 15 min. em cada etapa. Posteriormente, as amostras foram mantidas por 12  
28 horas em mistura acetona e resina Epon. As amostras foram transferidas para resina pura  
29 onde ficaram por mais 12 horas. Finalmente foram incluídas em resina Epon (Sigma, St.  
30 Louis, MO, USA) em suporte de silicone e colocadas para polimerização em estufa a 65 °C.  
31 Foram realizados cortes ultrafinos em ultramicrótomo EM UC6 (Leica, Wetzlar, Alemanha)  
32 em corte de 70 nm. Os cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados em acetato  
33 de uranila (5%) por 1h15min e citrato de chumbo por 4 min, e estocado em dissecador até o  
34 momento da avaliação em MET (JEOL, modelo JEM 1011, Tóquio, Japão) equipado com  
35 câmara CCD Gatan (Califórnia, EUA).

#### 36 *2.9. Análise estatística*

37 Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foram obtidas as  
38 médias e desvio-padrão e procedida à análise de variância (ANOVA). Para a comparação das  
39 médias, foi utilizado o teste de Tukey, de acordo com o coeficiente de variação obtido,  
40 considerando um nível de significância de 5%. Foi utilizado o PROC GLM (General Linear

1 Models) do Software SAS® (Statistical Analysis System) para Windows versão 9.0. Na  
2 correlação estatística do ensaio cometa para o índice de dano ao DNA espermático pós-  
3 descongelamento foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As análises da avaliação espermática  
4 por microscopia eletrônica de transmissão foram apresentadas de forma descritiva.

### 5 **3. Resultados**

6 Neste estudo, avaliou-se a influência da fragmentação do DNA espermático  
7 (utilizando o teste Cometa) no sêmen caprino. Os resultados da análise do comprimento da  
8 cauda do DNA realizado pelo “OpenComet” (teste Cometa) dos espermatozoides caprinos  
9 estão demonstrados na figura 1. Os dados informam o comprimento da cauda do DNA dos  
10 espermatozoides, cujo sêmen havia sido criopreservado em meio TRIS em diferentes  
11 concentrações de gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM) e TRIS com 2,5% de gema de  
12 ovo de *Gallus gallus domesticus* (GOGD - grupo controle) após análise pelo referido teste.

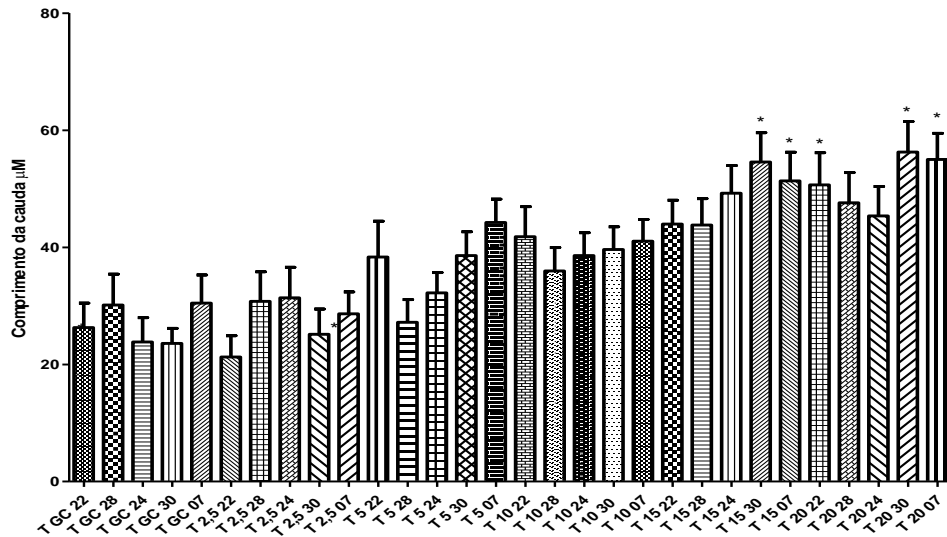
13 Quanto ao comprimento da cauda de DNA formada, não houve diferença  
14 significativa entre os grupos experimentais criopreservados em meio TRIS adicionados da  
15 gema de ovo de *Numida meleagris* (GONM) nas concentrações de 2,5%; 5,0%; e 10% quanto  
16 ao grupo controle (TRIS 2,5% GOGD) ( $P > 0,05$ ).

17 Observou-se ainda que o melhor grupo experimental, com mínima diferença  
18 significativa do grupo TRIS foi à GONM 2,5%, semelhante ao TRIS 2,5% da GOGD  
19 ( $P > 0,05$ ). Logo quanto menor o comprimento da cauda, menor será o dano e menos  
20 genotóxico será o diluente, visando a manutenção da viabilidade dos espermatozoides.

21 Os grupos experimentais TRIS 15% GONM e TRIS 20% GONM apresentaram  
22 diferença significativa em relação ao grupo controle TRIS 2,5% GOGD ( $P < 0,05$ ). Logo, o  
23 comprimento da cauda do DNA foi maior no grupo experimental TRIS 20% GONM, de  
24 acordo como demonstrado na figura, sugerindo uma ação, provavelmente, mais lesiva e  
25 tóxica na viabilidade dos espermatozoides.

26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

1 **Figura 1.** Registro do comprimento da cauda do DNA de espermatozoides caprinos  
 2 criopreservado em TRIS adicionado de diferentes concentrações da gema de ovo de *Numida*  
 3 *meleagris* pós-descongelamento através da análise do “OpenComet”.



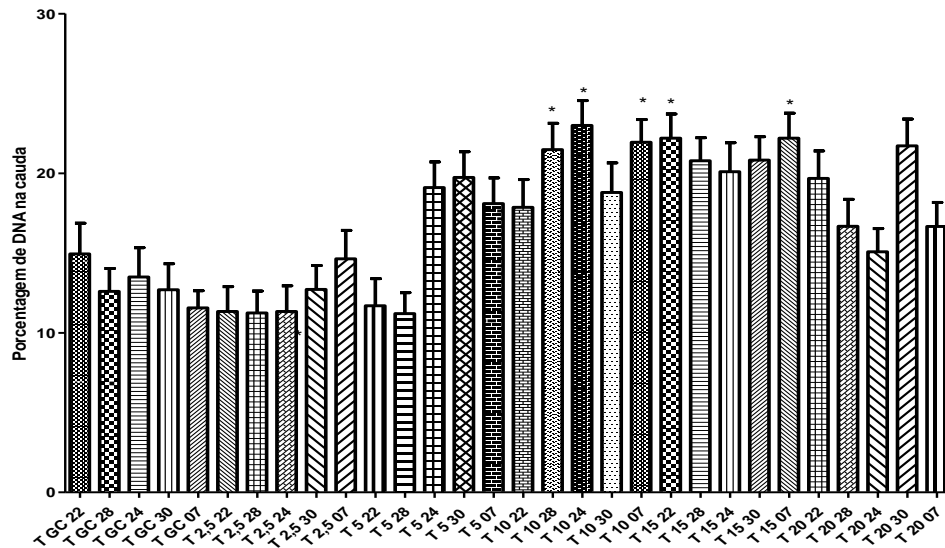
4  
 5 Fonte: Elaborada pelos autores (2021). (\*) comparado com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). T =  
 6 TRIS; GC = Grupo Controle; Dias da coleta (22/08; 28/09; 24/10; 30/11; 07/12); % das  
 7 amostras dos grupos experimentais (2,5%; 5%; 10%; 15%; 20%).

8  
 9 Não houve diferença estatística quanto ao percentual de DNA na cauda nos grupos  
 10 TRIS com 2,5%; 5,0%; e 20% da GONM em comparação ao grupo controle TRIS 2,5%  
 11 GOGD ( $P > 0,05$ ). Logo, o percentual de fragmentação do DNA foi semelhante entre os  
 12 grupos mencionados (figura 2).

13 Os grupos experimentais TRIS 10% de GONM e TRIS 15% de GONM  
 14 apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle TRIS 2,5% de GOGD ( $P <$   
 15  $0,05$ ). Pois, o percentual de DNA na cauda foi superior no TRIS 10% de GONM. Isso  
 16 demonstra que essas células espermáticas não são viáveis para uso, inclusive, em  
 17 biotecnologias reprodutivas, como a produção *in vitro* de embriões na etapa de fertilização  
 18 *in vitro* e inseminação artificial, uma vez que apresentaram fragmentação do DNA, material  
 19 genético indispensável para que a fecundação seja possível. Diante disso, ressalta-se que a  
 20 concentração de 10% de GONM não é indicada para a criopreservação de sêmen caprino. O  
 21 melhor grupo experimental sem diferença significativa foi o TRIS 2,5% de GONM.

22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29

1 **Figura 2.** Registro do percentual de fragmentação de DNA de espermatozoides caprinos  
 2 criopreservado em TRIS adicionado de diferentes concentrações da gema de ovo de *Numida*  
 3 *meleagris* pós-descongelção através da análise do “OpenComet”.



4  
 5 Fonte: Elaborada pelos autores (2021). (\*) comparado com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). T =  
 6 TRIS; GC = Grupo Controle; Dias da coleta (22/08; 28/09; 24/10; 30/11; 07/12); % das  
 7 amostras dos grupos experimentais (2,5%; 5%; 10%; 15%; 20%).

8

9 Na figura 3 observam-se os dados referentes ao grupo ACP-101c<sup>®</sup> em diferentes  
 10 concentrações de GONM e ACP-101c<sup>®</sup> e grupo controle (2,5% da GOGD), após análise pelo  
 11 teste cometa.

12 Não foi verificada diferença estatística entre os grupos experimentais ACP<sup>®</sup> com  
 13 GONM nas concentrações de 2,5% e 5% em comparação ao grupo controle (GOGD 2,5%)  
 14 ( $P > 0,05$ ).

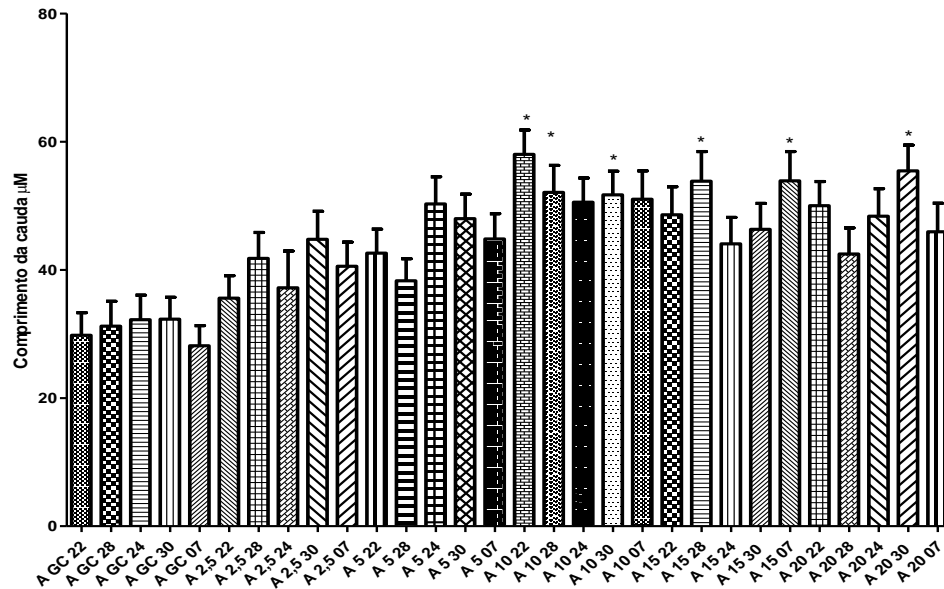
15 O grupo ACP<sup>®</sup> 2,5% GONM apresentou melhor viabilidade das células  
 16 espermáticas, apresentando menor diferença ao grupo controle ACP<sup>®</sup> 2,5% GOGD ( $P >$   
 17  $0,05$ ). O grupo ACP<sup>®</sup> 5% GONM apresentou comprimento de cauda de DNA maior do que  
 18 o grupo controle ( $P > 0,05$ ).

19 Os grupos experimentais ACP<sup>®</sup> com 10%, 15% e 20% de GONM apresentaram  
 20 comprimento de cauda de DNA maior, sendo considerados menos propícios e genotóxico à  
 21 criopreservação do sêmen caprino, apresentando diferença significativa ( $P > 0,05$ ).

22 Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ACP<sup>®</sup> com GONM  
 23 nas concentrações de 2,5% e 5% em comparação ao grupo controle (GOGD 2,5%) com  
 24 relação ao tamanho da cauda de DNA nos espermatozoides caprinos criopreservados em  
 25 ACP-101c<sup>®</sup> ( $P > 0,05$ ).



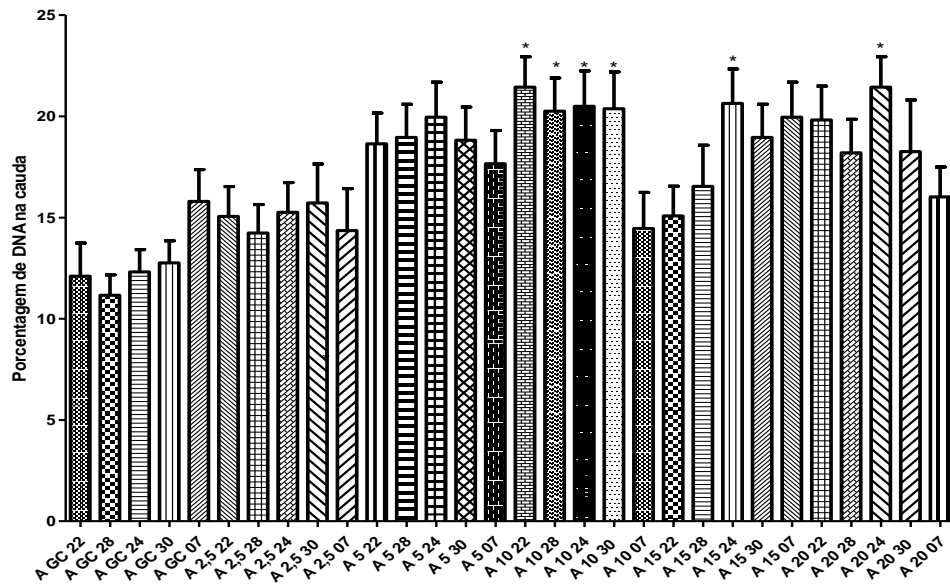
1 **Figura 3.** Registro do comprimento da cauda do DNA de espermatozoides caprinos  
 2 criopreservado em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações da gema de ovo de  
 3 *Numida meleagris* pós-descongelamento através da análise do “OpenComet”.



4  
 5 Fonte: Elaborada pelos autores (2021). (\*) comparado com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). A =  
 6 ACP-101c<sup>®</sup>; GC = Grupo Controle; Dias da coleta (22/08;28/09;24/10;30/11;07/12); % das  
 7 amostras dos grupos experimentais (2,5%;5%;10%;15%;20%).

8 Na figura 4 os grupos experimentais ACP<sup>®</sup> com 10%, 15% e 20% da GONM foram  
 9 considerados menos propícios à criopreservação do sêmen caprino, por apresentarem  
 10 porcentagens, maiores com baixa viabilidade para os espermatozoides quando comparado ao  
 11 grupo controle ACP<sup>®</sup> 2,5% GOGD ( $P < 0,05$ ) e ao grupo experimental com ACP<sup>®</sup> 2,5% e  
 12 5% de GONM.  
 13

1 **Figura 4.** Registro da porcentagem de DNA na cauda após análise do “OpenComet” de  
 2 espermatozoides caprinos criopreservado em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de diferentes  
 3 concentrações da gema de ovo de *Numida meleagris* pós-descongelamento.



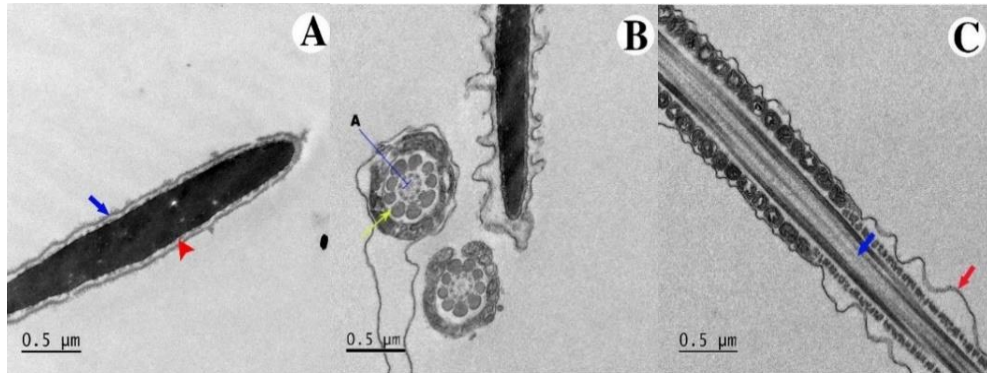
4  
 5 Fonte: Elaborada pelos autores (2021). (\*) comparado com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). A =  
 6 ACP-101c<sup>®</sup>; GC = Grupo Controle; Dias da coleta (22/08; 28/09; 24/10; 30/11; 07/12); %  
 7 das amostras dos grupos experimentais (2,5%; 5%; 10%; 15%; 20%).

8 Nas Figuras de 5 a 9 observam-se as ultraestruturas das células espermáticas pós-  
 9 descongelamento em microscopia eletrônica de transmissão (MET).

10 Nas Figuras 5 e 6 foi realizada análise ultraestrutural dos espermatozoides após  
 11 descongelamento, os quais foram criopreservados em meio ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 2,5% de  
 12 GOGD, por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Na figura 5, referente ao grupo  
 13 controle, foi possível verificar poucas alterações estruturais nas amostras analisadas, contudo,  
 14 identificou-se na região do flagelo um deslocamento da membrana plasmática que o recobre.  
 15 Na figura 6, em amostras desse mesmo grupo, foram identificadas regiões afetadas, sugerindo  
 16 que houve influência negativa do processo de criopreservação para a ocorrência das injúrias.

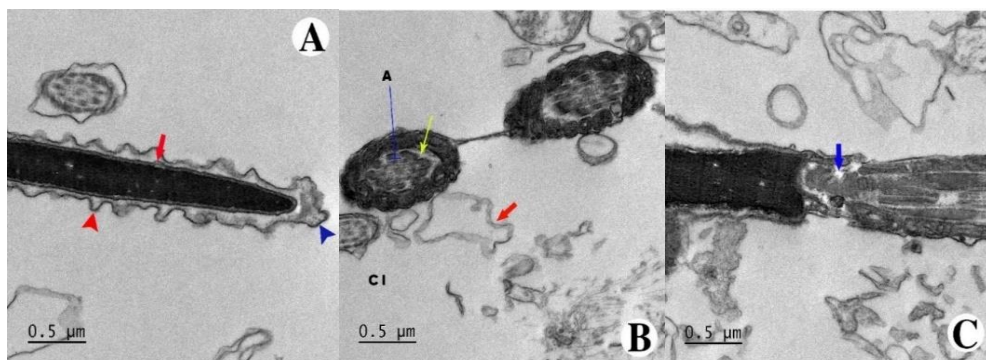
17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26

1 **Figura 5.** Análise ultraestrutural de espermatozoides após descongelação, os quais foram  
 2 criopreservados em meio ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 2,5% de gema de ovo de *Gallus gallus*  
 3 *domesticus* (grupo controle), por meio de microscopia eletrônica de transmissão.  
 4  
 5



6 Fonte: fotografia de propriedade dos autores (2021). Na imagem **A**, observa-se a membrana  
 7 plasmática (seta azul), região acrossomal e cromatina preservadas (cabeça de seta vermelha).  
 8 Na imagem **B**, verifica-se a transição entre peça intermediária e flagelo, colar mitocondrial  
 9 preservado com as organelas intactas e axonema (letra A), também preservado, com  
 10 elementos do citoesqueleto visíveis e de aspecto usual (seta amarela). Na Imagem **C**, verifica-  
 11 se região do flagelo em corte longitudinal onde se observa a disposição dos microtúbulos de  
 12 aspecto usual (seta azul). No entanto, ainda nesta região se observa um deslocamento da  
 13 membrana compatível com região terminal do flagelo (seta vermelha).

14 **Figura 6.** Análise ultraestrutural de espermatozoides caprinos após descongelação, os quais  
 15 foram criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 2,5% da gema de ovo de *Gallus gallus*  
 16 *domesticus* (grupo controle), através de microscopia eletrônica de transmissão.  
 17

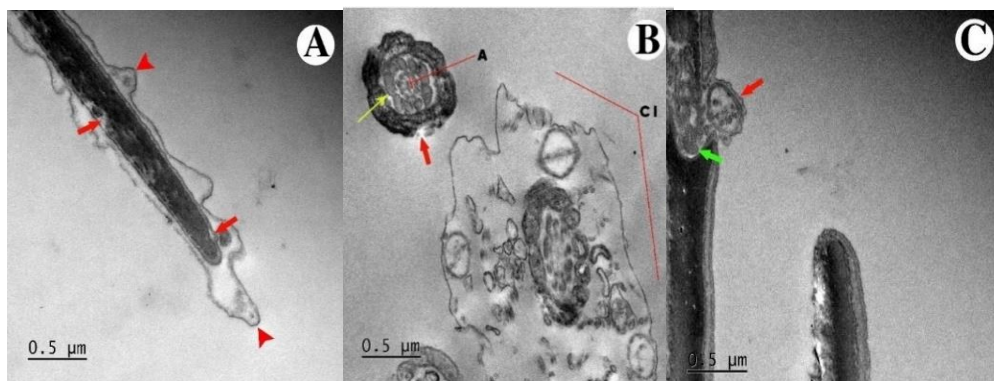


18 Fonte: fotografia de propriedade dos autores (2021). Na imagem **A**, demonstra-se associação  
 19 de membrana frouxa em torno da célula (cabeça de seta azul). São identificados também  
 20 pontos de deslocamento da cromatina (seta vermelha), esta ondulação de membrana é  
 21 condizente com regiões de edema (cabeça de seta vermelha). Região acrossomal desorganiza  
 22 (seta vermelha). Na imagem **B**, observa-se corte transversal da peça intermediária em  
 23 transição com flagelo, a seta amarela demonstra o colar de mitocôndrias preservado e região  
 24 de axonema típica com elementos de microtúbulo (letra A), seta vermelha demonstra apenas

1 fragmentos. Na imagem **C**, demonstra-se a região de centríolos preservada com  
 2 ultraestrutura típica para corte transversal (seta azul).

3 Na figura 7 observa-se o resultado da análise ultraestrutural dos espermatozoides  
 4 após descongelamento, os quais foram criopreservados em meio ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 10%  
 5 de GONM, por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Nessa amostra, foi  
 6 identificado um elevado grau de degradação nos componentes ultraestruturais, sendo  
 7 indicativo de baixa atividade de preservação do meio utilizado no processo de  
 8 criopreservação. Dessa forma, não recomendando-o para criopreservação de sêmen caprino.

9 **Figura 7.** Análise ultraestrutural de espermatozoides após descongelamento, os quais foram  
 10 criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 10% da gema de ovo de *Numida meleagris*,  
 11 por meio de microscopia eletrônica de transmissão.

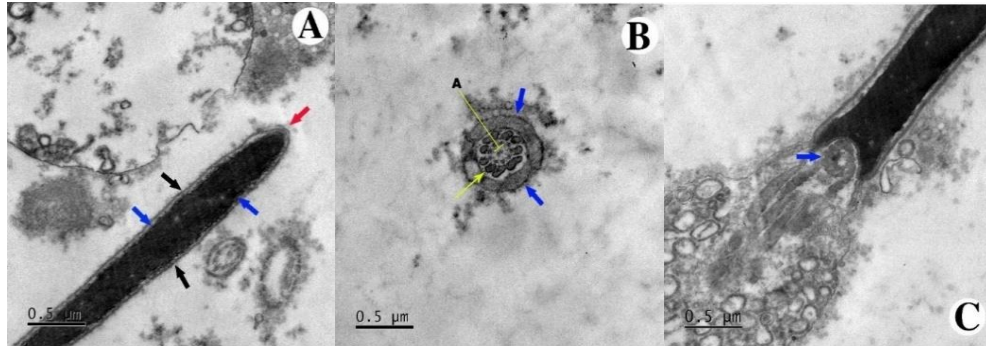


20 Fonte: fotografia de propriedade dos autores (2021). Na imagem **A**, demonstra-se diversas  
 21 protruções de membrana, o que evidencia descolamento da membrana na região da cabeça  
 22 do espermatozoide (cabeças de setas vermelhas). Ainda nessa região, a cromatina apresenta  
 23 áreas de esvaziamento (setas vermelhas). São visualizados elementos eletrondensos se  
 24 despreendendo da célula. Na imagem **B**, região de transição da peça intermediária com o  
 25 flagelo, apresentando colar mitocondrial preservado com axonema também preservado (letra  
 26 A e seta amarela), presença debris celulares (CI). Na imagem **C**, região de centríolo com  
 27 alterações morfológicas atípicas (seta verde), condensação de elementos eletrondensos  
 28 confinados em unidades de membrana se projetando para fora da estrutura do flagelo (seta  
 29 vermelha).

30 Na figura 8 observa-se o resultado da análise ultraestrutural dos espermatozoides  
 31 caprinos após descongelamento, os quais foram criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de  
 32 2,5% GONM, através de microscopia eletrônica de transmissão. Dentre os achados na  
 33 ultraestrutura celular, vale inferir que a célula espermática apresentou várias regiões  
 34 preservadas, com apenas uma alteração na região abaixo do centríolo, apresentando pequenas  
 35 vesículas indicativas de degeneração celular e perda de estabilidade estrutural da cauda do  
 36 espermatozoide. Resultado este, melhor do que o encontrado no grupo experimental ACP-  
 37 101c<sup>®</sup> adicionado de 10% de GONM (figura 7).

38

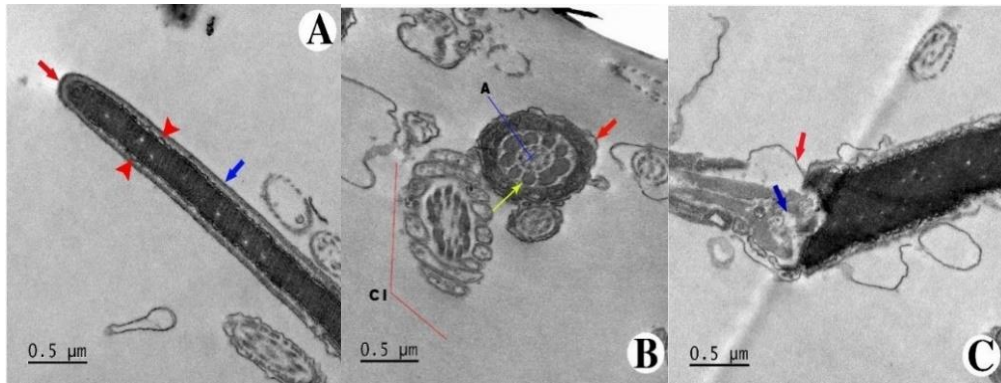
1 **Figura 8.** Análise ultraestrutural de espermatozoides caprinos após descongelamento, os quais  
 2 foram criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 2,5% da gema de ovo de *Numida*  
 3 *meleagris*, através de microscopia eletrônica de transmissão.



11 Fonte: fotografia de propriedade dos autores (2021). Na imagem A, demonstra-se região de  
 12 cabeça preservada, membranas íntegras com acrossoma preservado (setas pretas e seta  
 13 vermelha). Cromatina íntegra e com aspecto ultraestrutural normal em corte longitudinal  
 14 (setas azuis). Na imagem B, verifica-se a região de transição entre a peça intermediária e  
 15 flagelo. Mitocôndrias preservadas. Microtúbulos periféricos (seta amarela) e microtúbulos  
 16 centrais (letra A); axonema preservado (setas azuis). Na imagem C, demonstra-se centríolo  
 17 parcialmente preservado em corte longitudinal (seta azul). A região abaixo do centríolo  
 18 contém diversas pequenas vesículas indicativas de degeneração celular e perda de  
 19 estabilidade estrutural da cauda do espermatozóide. Essa amostra mostrou-se preservada, no entanto  
 20 foram encontradas células contendo desestruturação na região flagelar.

21 Na figura 9, observa-se o resultado da análise ultraestrutural dos espermatozoides  
 22 caprinos após descongelamento, os quais foram criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de  
 23 2,5% GOGD através de microscopia eletrônica de transmissão. Nessa amostra do grupo  
 24 controle foram evidenciadas alterações em nível de membrana e cromatina, embora, outras  
 25 regiões importantes da célula espermática estivessem preservadas. Vale salientar que o  
 26 acrossoma apresentou ultraestrutura bem preservada, tendo em vista ser uma organela  
 27 importantíssima para o processo de fertilização, pois alberga enzimas hidrolíticas  
 28 responsáveis pela penetração da célula espermática na zona pelúcida, fenômeno conhecido  
 29 como reação acrossomal.

1 **Figura 9.** Análise ultraestrutural de espermatozoides caprinos após descongelação, os quais  
 2 foram criopreservados em ACP-101c<sup>®</sup> adicionado de 2,5% da gema de ovo de *Gallus gallus*  
 3 *domesticus* (grupo controle), através de microscopia eletrônica de transmissão.  
 4  
 5



6 Fonte: fotografia de propriedade dos autores (2021). Na imagem A, demonstra-se a cabeça  
 7 do espermatozoide em corte transversal onde se observa a membrana e acrossoma com  
 8 aspectos ultraestruturais bem preservados (seta azul e seta vermelha). Cromatina com  
 9 deslocamento de membrana e cromatina apresentando pontos eletrólucidos, indicando perda  
 10 de material (cabeças de seta vermelha). Na imagem B, observa-se a região de transição entre  
 11 a peça intermediária e flagelo, onde verifica-se deslocamento de membrana (seta vermelha)  
 12 e colar de mitocôndrias com axonema e ultraestrutura conservada (seta amarela). Nessa  
 13 imagem é possível visualizar um grande número de células degradadas representadas pelos  
 14 diversos debris celulares (CI). Na imagem C, demonstra-se a região de centríolo com  
 15 alterações ultraestruturais importantes indicadas pelo descolamento da membrana (seta  
 16 vermelha) e regiões anormais eletrólucidas dentro do centríolo (seta azul) com presença de  
 17 estruturas membranares circulares e mitocôndrias laterais degeneradas.

#### 18 **4. Discussão**

19 De acordo com os resultados obtidos, neste estudo, quanto a avaliação do nível de  
 20 fragmentação espermática pelo teste cometa, foi possível identificar a importância de sua  
 21 realização, principalmente, quando com as amostras foram congeladas/descongeladas. Fato  
 22 este ratificado por Andrabi (2007), sendo o teste cometa capaz de estimar com precisão o  
 23 percentual de espermatozoides com danos na cromatina, o que prejudica a viabilidade da  
 24 célula, sobretudo, a capacidade fertilizante. Ademais, salienta-se a importância dessa técnica  
 25 na seleção de sêmen a ser utilizado em programas de inseminação artificial e fertilização *in*  
 26 *vitro* (Sakkas et al., 2004).

27 O processo de criopreservação pode gerar aumento de espécies reativas de oxigênio  
 28 (EROS) o que contribui significativamente, segundo Simões (2013), para a fragmentação do  
 29 DNA espermático. Além dessa causa, existem outras, como, por exemplo, a deficiência de  
 30 protamina, apoptose espermática (Simões, 2013).

31 Segundo Silva et al. (2018), a microscopia eletrônica de transmissão é uma  
 32 ferramenta utilizada para determinar o tamanho e a forma das estruturas orgânicas  
 33 (biológicas) e inorgânicas. Baseia-se na interação dos elétrons incidentes sobre a matéria. E  
 34 isso foi encontrado neste estudo.

1 Na imagem A da figura 5, as alterações de cromatina estão geralmente associadas  
2 às alterações morfológicas e, conseqüentemente, de motilidade (Enciso et al., 2011). Perdrix  
3 et al. (2011), verificaram que a presença de vacúolos com tamanho superior a 13% da área  
4 total da cabeça não tem relação com a fragmentação do DNA. Dados semelhantes foram  
5 encontrados no estudo realizado por Moura et al., (2013).

6 Essas degradações podem estar associadas a anomalias de acrossoma (Kacem et al.,  
7 2010; Perdrix et al., 2011; Lavolpe et al., 2015). Por outro lado, esses vacúolos, quando  
8 ocupam mais de 50% da superfície nuclear, têm sido associados ao aumento na fragmentação  
9 e desnaturação de DNA (Garolla et al., 2008; Franco et al., 2011), apresentando  
10 conseqüentemente baixa eficiência nas técnicas de reprodução assistida (Berkovitz et al.,  
11 2006).

12 A avaliação qualitativa da ultraestrutura dos espermatozoides por meio da  
13 microscopia eletrônica de transmissão possibilita identificar danos espermáticos (Silva et al.,  
14 2013), uma vez que abrange os dados de informações não visíveis e perceptíveis na análise  
15 por microscopia óptica simples.

16 Na análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão, neste estudo,  
17 não foram verificadas ações deletérias nos grupos controle e experimentais. As regiões da  
18 cabeça (membrana plasmática e acrossoma) mantiveram-se preservadas, sem alteração no  
19 DNA. As lesões de cabeça e cauda foram semelhantes às descritas para espermatozoides  
20 caprinos, mesmo estes apresentando tamanho, forma e composição lipídica distintas (Purdy,  
21 2006).

22 De acordo com o estudo desenvolvido por Ciftci; Zulkadir (2010) a avaliação  
23 nuclear do espermatozoide por meio da microscopia eletrônica de transmissão é realizada  
24 apenas em uma secção da cabeça, uma vez que o corte feito na amostra possui entre 50 e 100  
25 nm; enquanto que a cabeça do espermatozoide possui dimensão aproximada de 14 µm em  
26 seu diâmetro maior, e 7 µm em seu diâmetro menor.

27 A microscopia eletrônica de transmissão é uma ferramenta muito útil para avaliação  
28 de células, permitindo visualizar detalhes (com grande aumento e resolução) não vistos em  
29 outras técnicas. Apesar disso, em alguns casos, como na avaliação da cromatina nuclear de  
30 espermatozoides, por limitar a visualização apenas a uma secção da cabeça, faz-se necessário  
31 a utilização de uma grande amostra para tornar a avaliação confiável.

## 32 **5. Conclusão**

33 A gema de ovo de *Numida meleagris*, como crioprotetor adicionado aos meios  
34 diluentes ACP-101c<sup>®</sup> e TRIS, é um componente inédito, que tem resultados promissores na  
35 concentração de 2,5%, para a criopreservação do sêmen caprino. No entanto, não se exclui a  
36 necessidade de mais estudos para maior investigação e conseqüente validação desse  
37 componente.

## 38 **Referências**

39 Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P.,  
40 Bompadre, S., Battino, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and  
41 their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. Food and Chemical Toxicology.  
42 48, 2490-2499.

- 1 Andrabi, S.M.S. (2007). Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *Journal of*  
2 *assisted reproduction and genetics*. 24, 561-569.
- 3 Berkovitz, A., Eltes, F., Lederman, H., Peer, S., Ellenbogen, A., Feldberg, B., Bartoov, B. (2006). How to improve  
4 IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reproductive Biomedicine Online*. 12, 5, 634-638.
- 5 Burgess, C.M., Bredl, J.C.S., Plummer, J.M., Inglatterra, G.C. (2001). Vital and ultrastructural changes in dog  
6 spermatozoa during cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* 57, 357-363.
- 7 Brianezi, G.S., Camargo, J.L.V., Miot, H.A. (2009). Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise  
8 de imagem para avaliação do teste do Cometa corado pela prata. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina*  
9 *Laboratorial*. 45(4), 325-334.
- 10 Ciftci, H. B.; Zulkadir, U. (2010). The correlation between bull sperm head dimensions and mitochondrial helix  
11 length. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9(7), 1169-1172.
- 12 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Manual de exame andrológico, 2º Ed, Belo Horizonte, Brasil, 2013.
- 13 Enciso, M., Cisale, H., Johnston, S.D., Sarasa, J., Fernandez, J.L., Gosálvez, J. (2011). Major morphological sperm  
14 abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology*. 76(1), 23-32.
- 15 Franco, J.G.Jr., Mauri, A.L., Petersen, C.G., Massaro, F.C., Silva, L.F.I., Felipe, V., Cavagna, M., Pontes, A.,  
16 Baruffi, R.L.R., Oliveira, J.B.A., Vagnini, L.D. (2011). Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin  
17 packaging in human spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 35(1), 46-51.
- 18 Garolla, A., Fortini, D., Menegazzo, M., De Toni, L., Nicoletti, V., Moretti, A., Selice, R., Engl, B., Foresta, C.  
19 (2008). High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reproductive*  
20 *Biomedicine Online*. 17(5), 610-616.
- 21 Kacem, O., Sifer, C., Barraud-Lange, V., Ducot, B., De Ziegler, D., Poirot, C., Wolf, J. (2010). Sperm nuclear  
22 vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin.  
23 *Reproductive Biomedicine Online*. 20, 132-7.
- 24 Lavalpe, M., Lorenzi, D., Greco, E., Nodar, F., Sedó, C.A. (2015). Relationship Between Sperm DNA  
25 Fragmentation and Nuclear Vacuoles. *JBRA Assisted Reproduction*, 19(2), 70-74.
- 26 Moura, C.S., Nunes, A.K.S., Silva, B.S., Peixoto, C.A., Silva A.R., Silva, S.V., Gerra, M.M.P. (2013). Efeito da  
27 temperatura de descongelamento na integridade de espermatozoides criopreservados de cães. *Arquivo Brasileiro de*  
28 *Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65, 4.
- 29 Park, S.Y., Choi, J. (2007). Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental  
30 species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environmental International*. 33, 817-822.
- 31 Perdrix, A., Travers, A., Chelli, M.H., Escalier, D., Rego, J.L., Milazzo, J.P., Moussetsiméon, N., Macé, B., Rives,  
32 N. (2011). Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Human*  
33 *Reproduction*. 26, 47-58.
- 34 Purdy, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 63, 215-225.
- 35 Watt, B.; Merrill, A.L. (1963). *Composition of foods: raw, processed, prepared*. Washington: Consumer and Food  
36 Economics Research Division. 198.
- 37 Zaia, M.G. Efeito da *Mentha peperita* L. durante a infecção experimental por *Schistosoma mansoni*. (2015).  
38 Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) 89 f. – Universidade Federal de São Carlos,  
39 São Carlos, 2015.
- 40 Qin, Y.; Yang, S.; Xu, J.; Xia, C.; Li, X.; An, L.; Tian, J. (2018). Deep insemination with sex-sorted Cashmere goat  
41 sperm processed in the presence of antioxidants. *Reproduction in domestic animals*. 53(1), 11-19.
- 42 Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive  
43 compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. 121, 996-  
44 1002.
- 45 Sakkas, D., Seli, E., Manicardi, G.C.; Nijs, M., Ombelet, W., Bizzaro, D. (2004). The presence of abnormal  
46 spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail. *Humam Fertility*. 7, 99-103.
- 47 Salgueiro, C.C.M., Nunes, J.F. (2012). Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos. *Ciência*  
48 *Animal*. 22(1), 20-32.
- 49 Simões, R., Feitosa, W.B., Siqueira, A.F.P., Nichi, M., Paula-Lopes, F.F., Marques, M.G., Peres, M.A., Barnabe,  
50 V.H., Visintin, J.A., Assumpção, M.E.O. (2013). Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress  
51 on early embryo in vitro development outcome. *Reproduction*. 146, 433-441.
- 52 Silva, H.V.R., Nunes, T.G.P., Mota Filho, A.C., Pinto, J.N., Silva, A.R., Silva, L.D.M. (2018). Adição de  
53 hidroxitolueno butilado (bht) no diluidor acp-106c para congelamento de sêmen canino. *Ciência Animal Brasileira*. 19,  
54 1-9.
- 55 Silva, M.A., Peixoto, G.C.X., Castelo, T.S., Lima, G.L., Silv, A.M., Oliveira, M.F., Silva, A.R. 2013.  
56 Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing  
57 rates. *Cryobiology*. 67(1), 50-55.
- 58 Silva, S.V., Guerra, M.M.P. (2011). Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para  
59 redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35, 370-384.
- 60  
61  
62  
63  
64  
65



## 6 CONCLUSÃO

A obtenção de bons índices de viabilidade seminal é possível, desde que a formulação do diluente leve em consideração as características fisiológicas do sêmen da espécie (pH, tolerância osmótica, composição da membrana plasmática), como também a variabilidade individual.

O diluente à base de água de coco em pó para sêmen de caprino adicionado de gema de ovo de *Numida meleagris*, é promissor na criopreservação dos espermatozoides caprinos, rica em complexos lipoproteicos.

A gema de ovo de *Numida meleagris*, como crioprotetor externo da membrana, acrescida aos diluentes ACP-101c<sup>®</sup> ou TRIS, melhora a qualidade seminal do sêmen caprino, reduzindo danos ocasionados durante o processo de congelação-descongelação, tornando-se uma opção viável para seu uso em processos de criopreservação de sêmen de caprinos.

O uso da gema de ovo de *Numida meleagris* adicionada ao diluente ACP-101c<sup>®</sup> ou TRIS como crioprotetor externo, apresenta importância, social e tecnológica, indo ao encontro e desenvolvimento de produtos biotecnológicos alternativos aos existentes atualmente no mercado, além de contribuir para o desenvolvimento regional e favorecendo a cadeia produtiva de criadores dessa espécie de aves.

## 7 PERSPECTIVAS

A gema de ovo de *Numida meleagris* em meio à base diluentes de ACP® e TRIS é uma alternativa para a criopreservação do sêmen caprino. A mesma possui excelentes valores nutricionais valores de proteína. Contudo, é de extrema importância mais estudos direcionados à suplementação desse meio diluente/crioprotetor afim de ajustá-lo para incrementar a viabilidade e garantir melhorias no potencial fecundante dos espermatozoides caprinos submetidos a criopreservação/descongelação.

## REFERÊNCIAS

ADENOWO, J.A.; AWE, F.A.; ADEBAMBO, O.A.; IKEOBI, C.O.N. Species variations in chemical composition of local poultry eggs. In: ANNUAL NSAP CONFERENCE, 26., 1999, Ilorin, **Proceedings...** Ilorin, Nigeria. 1999. p.278-280.

ADEYEYE, E.I. Characteristic composition of guinea fowl (*Numida Meleagris*) eGG. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.1, n. 2, 2010.

AGUIAR, G. V. ; SANTOS, B. M. B. ; CAVALCANTE, J. M. M. ; RODRIGUES, F. R. N. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; NUNES, J. F. Adição de aloe vera ao diluente à base de água de coco em pó (ACP-101) como crioprotetor do sêmen caprino resfriado a 4 °C. **Ciencia Animal (UECE)**, v. 22, p. 283-286, 2012.

AISEN, E.G. **Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: MedVet, 2008. v.1, 203p.

ALMEIDA, J.L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen eqüino**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. *et al.* Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2490-2499, 2011.

AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, n.3, p.317-325, 2004.

AMIDI, F.; FARSHAD, A.; KHOR, A.K. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. **Cryobiology**, v.61, p.94-99, 2010.

ANAND, M.; BAGHEL, G.; YADAV, S. Effect of egg yolk concentration and washing on sperm quality following cryopreservation in barbari buck semen. **Journal of Applied Animal Research**, v.45, n.1, p.560-565, 2017.

ANDRABI, S.M.S. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 24, p. 561-569, 2007.

ANDRABI, S.M.H., ANSARI, M.S., ULLAH, N., ANWAR, M., MEHMOOD, A., AKHTER, S. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 427-433, 2008.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum***. 2003. 135 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ANSARI M.; Towhidi A.; Moradi Shahrababak M.; Bahreini M.. Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in goat. **Slovak Journal of Animal Science**, v. 45, n. 1, p. 7-13, 2012.

ANTON M, GANDEMER G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. **J Food Sci**, v.62, p.484-487, 1997.

ANTON M, MARTINET V, DALGALARRONDO M, BEAUMAL E, DAVID-BRIAND E, RABESONA H. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chem**, v.83, p.175-183, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC, 2006.

ARANGASAMY, A., M. VENKATA KRISHNAIAH; N. MANOHAR; S. SELVARAJU; P.R. GUVVALA; N.M. SOREN; I.J. REDDY; K.S. ROY AND J.P. RAVINDRA. Advancement of puberty and enhancement of seminal characteristics by supplementation of trace minerals to bucks. **Theriog.**, v. 110, p. 182-191, 2018.

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

ARAUJO, I. S. **Utilização da água de coco e do leite glicosado como diluidor do sêmen ovino**. 1990. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1990.

ARRUDA, R.P. *et al.* Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, 2011.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 41, p. 395-406, 1987.

ÁVILA-PORTILLO, L. M.; MADERO, J. I.; LÓPEZ, C.; LEÓN, M. F.; ACOSTA, L.; GÓMEZ, C.; DELGADO, L. G.; GÓMEZ, C.; LOZANO, J. M.; REGUERO, M. T. Fundamentos de criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetrícia y Ginecología**, v. 57, p. 291-300, 2006.

AZERÊDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257-263, 2001.

BACHA JR, W. J.; BACHA, L. M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: editora Roca, 2003. p.335-336.

BANDEIRA, N. C.; FERNANDES, J. S.; BRAGA FILHO, C. T.; CÂMARA, T.S.; AGUIAR, G. V. ; NUNES, J. F. Integridade da membrana plasmática do espermatozoide caprino diluído em ACP101® adicionado com gema de ovo ou extrato de soja. **Ciencia Animal (UECE)**, v. 22, p. 429-431, 2012.

BARBOSA, C. C.; MADEIRA, V. L. H. ; JUCA, R. ; OLIVEIRA, A. C. ; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®): Efeito da temperatura de adição do glicerol (27 e 4°C). **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 1209-1217, 2009.

BARBOSA, C. C.; MADEIRA, V. L. H. ; JUCA, R. P. ; OLIVEIRA, A. C. ; UCHOA, D. C. ; PINHEIRO, A. Q. ; SILVA, L. D. M. Diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina no sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, p. 270-281, 2010.

BARBOSA, B. S. ; IZZO, R. G. ; SILVA, H. V. R. ; NUNES, J. F.; THALLES G. P.; BRITO, B. F. ; SILVA, T. F. P. ; SILVA, L. D. M. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from domestic cat using powdered coconut water (ACP-117c) and TRIS extenders. **Cryobiology**, v. 92, p. 103-108, 2020.

BARÇANTE, F. P. S. ; SILVA, J. H. L. ; BRANCO, Y. N. T. C. C. ; LUSTOSA, M. S. C.; SALGUEIRO, C. C. M. ; CARDOSO, J. F. S. ; NUNES, J. F. ; PAULA, N. R. O. . Uso do diluidor ACP102 com e sem gema de ovo no sêmen resfriado de ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 484-486, 2016.

BARRETO SCS, ZAPATA JFF, FREITAS ER, FUENTES MFF, NASCIMENTO RF, ARAÚJO SRSM, AMORIM AGN. Ácidos graxos da gema e composição do ovo de poedeiras alimentadas com rações com farelo de coco. **Pesq Agropec Bras**, v.41, p.1767-1773, 2006.

BARROS, P.M.H.; NICHI, M.; CORTADA, C.N.M. Semen evaluation of Murrah buffalo bulls using sperm functional tests. **Ital. J. Anim. Sci.**, v. 6, suppl. 2, p. 772-774, 2007.

BARROS T.B., TONIOLLI R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 400-407, 2011.

BARROS, T.B. ; TONIOLLI, L. S. ; GUIMARAES, D. B. ; FREITAS, E.N. ; NUNES, T.G.P. ; TONIOLLI, R. Curvas de resfriamento do sêmen do varrão diluído em acp®103 adicionado de gema de ovo em concentração fixa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, p. 540-549, 2016.

BARROS, T.B. ; TONIOLLI, R. ; TONIOLLI, L. S. ; GUIMARAES, D. B. ; ARAÚJO, L.R.S. ; Dias, A.V. . Qualidade espermática do ejaculado suíno conservado a 10 °C no diluente ACP-103® adicionado de gema de ovo. **Revista de Ciências da vida**, v. 34, p. 102-113, 2017.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.

BASHIR, L.; OSSAI, P. C.; SHITTU, O. K.; ABUBAKAR, A. N.; CALE, T. Comparison of the Nutritional Value of Egg Yolk and Egg Albumin from Domestic Chicken, Guinea Fowl and Hybrid Chicken. **American Journal of Experimental Agriculture**, v. 6, n. 5, p. 310-316, 2015.

BATHGATE R, MAXWELL WMC, EVANS G. Studies on the effect supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. **Reprod Domest Anim**, v.41, p.68-73, 2006.

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

BENCHARIF, D.; AMIRAT, L.; ANTON, M.; SCHMITT, E.; DESHERCES, S.; DELHOMME, G. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v.70, p.1478–1488, 2008.

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

BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 120-126, 2007.

BERKOVITZ, A.; ELTES, F.; LEDERMAN, H.; PEER, S.; ELLENBOGEN, A.; FELDBERG, B.; BARTOOV, B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. **Reproductive Biomedicine Online**, v.12, n.5, p.634–638, 2006.

BEZERRA F.S.B. **Criopreservação do sêmen caprino: efeito de diferentes palhetas, taxas de descongelamento e crioprotetores**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2009.

BEZERRA F.S.B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. **Acta Veterinária Brasília**, v. 4, p. 20-25, 2010.

BISPO, C. A. S. **Fertilidade do sêmen caprino resfriado ou congelado em diferentes concentrações de gema de ovo no diluente**. 2009. 165f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2009.

BISPO, C. A. S. et al. Características in vitro e fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5° C por 24 horas utilizando duas concentrações de gema de ovo no diluente. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 653-660, 2011.

BITTENCOURT R.F.; RIBEIRO A.L.; SANTOS A.D.F.; FURST R.; TEIXEIRA R.B.S.; CHALHOUB M., PORTELA A.P., ALVES S.G.G., ALMEIDA A.K.; GUIMARÃES J.D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, p. 27-32, 2004.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.

BORYSHPOLETS, S.; KOWALSKI, R.K.; DIETRICH, G.J.; DZYUBA, B.; CIERESZKO, A.. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. **Theriogenology**, v.80, n.7, p.758-765, 2013.

BRAGA, C.V.P.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R.; CARVALHO, L.E.; SOUSA F.M.; BASTOS, S.C. Efeito da inclusão do farelo de coco em rações para poedeiras comerciais. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.34, p.76-80, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebens mittel-Wissens chaft& Technologie**, v.22, n.1, p. 25-30, 1995.

BRASILEIRO, L. S.; SEGABINAZZI, L. G. T. M. ; MENEZES, E. ; SALGUEIRO, C. ; NOVELLO, G. ; SCHEEREN, V. F. C. ; ALVARENGA, M. A. ; NUNES, J. F. . Coconut Water as an Extender Component for Cooled Equine Sperm. **Journal of equine Veterinary Science**, v. 78, p. 69-73, 2019.

BRIANEZI, G. S.; CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do Cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

BRITO, B. F. ; MAIA FILHO, S. P. ; FARIAS, P. P. Q. ; CÂMARA, T.S. ; AGUIAR, G. V. ; NUNES, J. F. . Viabilidade espermática do sêmen ovino resfriado à base de água de coco em pó (ACP-102®) adicionado de Aloe vera ou gema de ovo. **Ciencia Animal (UECE)**, v. 22, p. 509-512, 2012.

BRITO, B. F. ; ANTUNES, L. P. ; RODRIGUES, F. R. N. ; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M. ; NUNES, J.; F.. Efeito do Aloe vera adicionado de diferentes concentrações de água de coco em pó (ACP-102) no sêmen ovino diluído e incubado por duas horas. **Acta Veterinaria Brasilica (UFERSA)**, v. 8, p. 242-243, 2014.

BRITO, B. F. ; SANTOS, B. M. B. ; CABRAL, L. A. R. ; LIMA, D. B. C. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; NUNES, José Ferreira . Influência do meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-102c) na manutenção da atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, p. 1715, 2019.

BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHIN, A.; VARIŞLI, Ö.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, p. 1060-1067, 2007.

BURGESS, C.M.; BREDL, J.C.S.; PLUMMER, J.M.; INGLATERRA, G.C. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. **J. Reprod. Fertil.**, v.57, p.357-363, 2001.

BURLEY RW, EVANS AJ, PEARSON JA. Molecular aspects of the synthesis and deposition of hen's egg yolk with special reference to low-density lipoprotein. **Poult Sci**, v.72, p.850-855, 1993.

BÜYÜKLEBLEBICI, S.; TASDEMİR, U.; OZGURTAS, T.; DURMAZ, E.; BUYUKLEBLEBICI, O. The Comparison of Three Different Cryoprotectants in Cryopreservation of Angora Goat Semen. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 20, n. 4, p. 613-619, 2014.

CABRERA F.; GONZÁLEZ F.; BATISTA M.; CALERO P.; MEDRANO A.; GRACIA A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary Buck (*Capra hircus*). **Reprod. Dom. Anim.**, v. 40, n. 195, 2005.

CAIXETA, F. M. C. **Transferência de genoma em ovócitos bovinos frescos e vitrificados**: produção de embriões. 2020. 80f. Tese (Doturoado em Agronomia e Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, 2020.



CALDERAM, I. B. K.; MASCHIO, É. F.; MADEIRA, E. M.; ULGUIM, R. R.; RAMBO, G.; CORRÊA, É. K.; LUCIA Jr, T.; DESCHAMPS, J. C.; CORRÊA, M. N. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1978-1983, 2008.

CÂMARA, T. S.; BANDEIRA, N. C.; FERNANDES, J. S.; SALGUEIRO, C. C. M.; AGUIAR, G. V. ; NUNES, J. F. . Avaliação do efeito crioprotetor da Aloe vera no congelamento do sêmen ovino. **Ciencia Animal**, v. 22, p. 310-313, 2012.

CÂMARA, T. S.; MACHADO, A. A. C. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; SILVA, J. H. L. ; BARÇANTE, F. P. S. ; SOUSA JUNIOR, A. ; LIMA, D. B. C. ; NUNES, J. F. . Avaliação do sêmen fresco e criopreservado de caprinos autóctones no Estado do Piauí: Resultados preliminares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 40, p. 340-341, 2016.

CÂMARA, T. S.; SOUSA JÚNIOR, A.; BARÇANTE, F. P. S.; SILVA, J. H. L.; SOUSA, M. S.; MACHADO, A. A. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MONTENEGRO, A. R.; NUNES, J. F. Comparação da qualidade seminal de caprinos das raças Canindé e Alpina Britânica no Nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 4, p. 1260–1268, 2019.

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

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; UCHOA, D. C. ; SILVA, T. F. P. ; SILVA, L. D. M. . Efeito da diluição pós-descongelamento e do método de armazenagem do diluidor ACP-106 sobre a criopreservação de sêmen canino. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UECE, 9.; ENCONTRO DE PESQUISADORES, 10., 2004, Fortaleza. **Anais....** Fortaleza: UECE, 2004. v. 2. p. 1-1

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. ; CHIRINÉA, V. H.; SOUZA, F. F. ; LOPES, M. D. . Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106® using an in vitro sperm–oocyte interaction assay. **Reproduction in Domestic Animals**, Inglaterra, v. 42, n.1, p. 11-16, 2007.

CARDOSO, J. F. S.; PAULA, N. R. O. ; UCHOA, D. C. ; SILVA, L. D. M. . Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. **Comunicata Scientiae (Print)**, v. 1, p. 146-152, 2010.

CARDOSO, J. F. S. ; SILVA, L. D. M. ; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. . **Meio de diluição de sêmen canídeo e processo de preservação do mesmo**. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI11016108. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 06/04/2011.

CARDOSO, J. F. S. ; PAULA, N. R. O. ; UCHÔA, D. C. ; MOTA FILHO, A. C. ; SALGUEIRO, C. C. M.; SILVA, L. D. M. . Etilenoglicol como crioprotetor para congelação do sêmen canino em diluente à base de água de coco em pó (ACP-106c). **Ciência Animal**, v. 22, p. 534-537, 2012a.

CARDOSO, J. F. S. ; PAULA, N. R. O. ; UCHÔA, D. C. ; MOTA FILHO, A. C. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; SILVA, L. D. M. . Reduced egg yolk concentration in the extender for canine semen cryopreservation improves the assessment quality in computer-assisted semen analyzer system. **Ciência Animal**, v. 22, p. 563-566, 2012b.

CARDOSO, R. C. S. ; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. . Efeito da diluição espermática na congelação de sêmen canino utilizando-se a água de coco em pó (ACP®-106) como diluidor. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 15, n.2, p. 75-82, 2005a.

CARDOSO, R. C. S. ; SILVA, A. R. ; SILVA, L. D. M. . Use of the powdered coconut water (ACP-106 ® ) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 2, n.4, p. 257-262, 2005b.

CARVALHO, J.M.; MAIA, G.A.; SOUSA P.H.M.; JUNIOR, G.A.M.. Água de coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 3, p. 437-452, 2006.

CARVALHO, M. A. M. ; LINHARES, F. R. A. ; NUNES, J. F. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; COSTA, R. B. ; SALES, R. O. . Coconut water as extender for sperm of freshwater fish with external fertilization. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, p. 203-222, 2014a.

CARVALHO, M. A. M.; NUNES, L. T. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; OLIVEIRA, F. C. E. ; CATUNDA, A. G. V. ; NUNES, J. F.. Motilidade do sêmen de carpa comum, *Cyprinus carpio*, após congelação rápida em meio à base de água de coco em pó (ACP-104). **Acta Veterinaria Brasilica (UFERSA)**, v. 8, p. 225-226, 2014b.

CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

CASTRO, B. K. L. ; CABRAL, L. A. R. ; SANTOS, B. M. B. ; BRITO, B. F. ; SANTOS, M. H. ; LIMA, D. B. C. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; NUNES, J. F. . Meio de preservação à base de água de coco em pó (ACP-102c) é eficaz na manutenção da atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 436-438, 2016.

CAVALCANTE, J. M. M. ; AGUIAR, G. V. ; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. ; NUNES, J. F. . Efeito da adição de plasma seminal ao diluidor ACP-102c nas subpopulações espermáticas avaliadas em sistema CASA do sêmen ovino criopreservado. **Ciencia Animal**, v. 22, p. 349-352, 2012.

CAVALCANTE, J. M. M. ; BRASIL, O. O. ; SALGUEIRO, C. M. ; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. ; NUNES, J. F. . Criopreservação do sêmen de ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c). **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 344-353, 2014.

CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; Arruda, R. P.. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.536, 2010.

CIFTCI, H. B.; ZULKADIR, U. The correlation between bull sperm head dimensions and mitochondrial helix length. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.7, p.1169-1172, 2010.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

COLENBRANDER, B.; STOUT, T. Techniques for Evaluating Frozen Semen. **Equine Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 2994-3004, 2011.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 305–311, 2013.

COLLINS, A. R. The comet assay: topical inssues. *Mutagenesis*.v.23, p. 143-151, 2008.

CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. **Current Veterinary Therapy**. Philadelphia: WB Saunders, 1989. p. 1247- 1259.

CORDEIRO, M. A. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; MAGALHÃES, D. M. ; NUNES, J. F. ; MATEOS-REX, E. . Avaliação da fertilidade de cabras inseminadas com sêmen congelado de bodes diluído em TRIS ou em água de coco in natura. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17., 2003, Beberibe. **Acta...** Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 298-299.

CORDEIRO, M. A. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; GONDIM, J. M. ; CAVALCANTE, J. M. M. ; SOUZA, P. T. ; FIGUEIRÊDO, E. L. ; DIÓGENES FILHO, R. N. ; NUNES, J. F. . Avaliação do efeito dos diluentes ACP-102 ou água de coco in natura (ACIN), acrescidos ou não de gema de ovo, sobre a viabilidade do sêmen ovino resfriados a 4° C. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 1., 2004a, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UECE, 2004a. v. 9. p. 665.

CORDEIRO, M. A. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; GONDIM, J. M. ; CAVALCANTE, J. M. M. ; SOUZA, P. T. ; FIGUEIRÊDO, E. L. ; DIÓGENES FILHO, R. N. ; NUNES, J. F. . Avaliação do efeito in vivo dos diluentes ACP-102® ou ACIN sobre a fertilidade de ovelhas inseminadas artificialmente com sêmen resfriado a 4<sup>o</sup> C e conservado por 24 horas. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 1., 2004a, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UECE, 2004a. v. 9. p. 666.

COX JF, ALFARO V, MONTENEGRO V, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, n. 860-867, 2006.

CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; ALBERTI, K.. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **ARS Veterinaria**, v. 22, n. 3, p. 229-235, 2006.

CRUZ, J.F.. Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido a temperatura de 4<sup>o</sup> C por um período de 48 horas diluído em frações ativas da água de coco. 1994. 125f. Dissertação (Mestrado em produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceara, Fortaleza, 1994.

CUNHA, I. C. N. **Criopreservação do sêmen de cães**. 2002. 145f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

DEKA, B.C.; RAO, A.R. Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen Buck semen. **Indian Veterinary Journal**, v. 62, p. 414-417, 1985.

DIAS, J. C. O. **Adição de Ringer Lactato, Citeato de Sódio 2,92% e solução Tris em sêmen caprino**. 2010. 162f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Federal de Viçosa, 2010.

DORADO, J.; RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v.68, p.168-177, 2007.

DORADO, J.; MUÑOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1, p. 115-123, 2010.

DUDUSOLA, I.O. Comparative evaluation of internal and external qualities of eggs from quail and guinea fowl. **International Research Journal of Plant Science**, v. 1, n. 5, p. 112-115, 2010.

DYCE, K. M.; SACK, M. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. Ed. Rio de Janeiro Elsevier, 2004.

DYER-HURDON JN, NNANNA IA. Cholesterol content and functionality of plasma and granules fractionated from egg yolk. **J Food Sci**, v.58, p.1277-1281, 1993.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.; SARASA, J.; FERNANDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v.76, n.1, p.23-32, 2011.

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

EVANS AJ, BURLEY RW. Proteolysis of apoprotein B during the transfer of very low density lipoprotein from hen's blood to egg yolk. **J Biol Chem**, v.262, p.501-504, 1987.

FAHY, G.M. Analysis of solution effects injury equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl dimethylsulfoxide water and NaCl glycerol water. **Biophys. J.**, v. 32, p. 837–850, 1980.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO (2017)**. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. Acesso em 09 mar. 2019.

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

FARIAS, P. P. Q. ; BRITO, B. F. ; MAIA FILHO, S. P. ; SANTOS, B.M.B. ; NUNES, J. F. ; AGUIAR, G. V. . Parâmetros cinéticos dos espermatozoides ovinos diluídos em meio a base de água de coco em pó (ACP-102®) adicionada de Aloe vera ou gema de ovo. **Ciencia Animal**, v. 22, p. 451-453, 2012.

FARREL, P.B. ROBERT, H. FOOTE.; MARGARET, M. M.; VICTORIA L. TROUERN-TREND; ANGELA, L. F.. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v.17, p.293-300, 1996.

FARSHAD, A.; KHALILI, B., FAZELI, P. The effect of different concentrations of glycerol and DMSO on viability of Markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 3, p. 239-245, 2009.

FERNANDES, A. C.; HAROLD, B.; MAIA, H.; RAUTER, A.P.; AUGUSTO, J.; RODRIGUES, R. **Guia IUPAC para a nomenclatura de compostos orgânicos**. Lisboa: Lidel, 220 p, 2002.

FERNANDES, J. S. ; BANDEIRA, N. C. ; OLIVEIRA, J. C. G. ; CÂMARA, T.S. ; SANTOS, B.M.B. ; NUNES, J. F. . Cinética espermática do sêmen caprino resfriado à base de água de coco em pó (ACP-101®) adicionado de extrato soja e gema de ovo. **Ciencia Animal**, v. 22, p. 327-330, 2012.

FERRARI, S.; BARNABE, V.H. Effect of two kinds of diluents and two freezing methods on caprine semen quality. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.36, p.1-4, 1999.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **Europe Journal Wildlife Research**, v. 53, p. 81-89, 2007.

FONSECA J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005. Goiânia, GO. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, 2005.

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S. M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L. ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H. R.; NASR-ESFAHANI, M. H. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v.73, n.4, p.480–487, 2010.

FRANCO, J.G.Jr.; MAURI, A.L.; PETERSEN, C.G.; MASSARO, F.C.; SILVA, L.F.I.; FELIPE, V.; CAVAGNA, M.; PONTES, A.; BARUFFI, R.L.R.; OLIVEIRA, J.B.A.; VAGNINI, L.D. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.35, n.1, p.46-51, 2011.

FREITAS, V.J.F. **Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina coriônica humana (HCG), inseminadas artificialmente**. 1988f. 56f. trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Veterinária) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1988.

FREITAS, V. J. F. **Parâmetros andrológicos e avaliação "in vitro" do sêmen de ovinos deslançados criados na região litorânea do Nordeste brasileiro em estação seca e chuvosa**. 1992. 165f. Tese (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1992).

FROTA, L. O.; GALDINO, L. C. A.; CATUNDA, A. G. V. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; SOBRAL, M. H. N. R.; NUNES, J. F.. Inseminação artificial com sêmen de *Numida meleagris* diluído em meio à base de água de coco em pó. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, p. 45-46, 2014.

FURTADO, L. L. ; BRAGA, C. C. E. ; PORFIRIO, K. P. ; OLIVEIRA, M. S. ; TEIXEIRA, L. S. A. ; MACEDO, L. F. B. ; AMORIM, R. C. ; CARDOSO, J. F. S. ; MINEIRO, A. L. B. B. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; NUNES, J. F. ; PAULA, N. R. O.. Inseminação artificial cervical e laparoscópica em cabras mestiças de Anglo-Nubiana utilizando sêmen congelado/descongelado diluído em ACP-101/102. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, p. 550, 2019.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.P.; JOHNSON, L.A. AND PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biol Reprod.**, 34, 127-138, 1986.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; YUE, S.T.; ROTH, B.L.; HAUGLAND, R.P. Dual DNA staining assessment for bovine sperm viability using SYBR 14 and propidium iodide. **J. Androl**, v.15, p.620-629, 1994.

GAROLLA, A.; FORTINI, D.; MENEGAZZO, M.; DE TONI, L.; NICOLETTI, V.; MORETTI, A.; SELICE, R.; ENGL, B.; FORESTA, C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. **Reproductive Biomedicine Online**, v.17, n.5, p.610–616, 2008.

GIBBONS, A. Inseminación artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus**, v. 4, n. 16, p. 24-32, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

GONZALES, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. 2004. 164f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E. and HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biol Reprod.**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GRAHAM, J. K., WILHELM, K. M., SQUIRES, E. L.. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion sperm with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. **Theriogenology**, v. 46, p. 559-578, 1996.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, p.131-147, 1996.

GUIMARAES, D. B.; BARROS, T.B. ; CANTANHÊDE, L.F. ; FEUGANG, J.M.N. ; SOUSA, L.P. ; TONIOLLI, R. . Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno diluído em água de coco em pó visando sua criopreservação.. **Ciência Animal Brasileira (Online)**, v. 19, p. 01-16, 2018.

GUTHRIE, H.D.; WELCH G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **J. Anim. Sci.**, v.84, p.2089-2100, 2006.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7 ed. Barueri,SP: Manole, 2004. 530p.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAN, J. K. Cryopreservation of mammalian sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-38, 1992.

HAN, B.; BISCHOF, J. C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. **Cryobiology**, v. 48, n. 1, p. 8-21, 2004.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Jornal of Reproduction and Fertility**, v.88, p. 343 -343, 1990.

HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; MAT NOOR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosome-reacted goat sperm. **Biomedical Research**, v.16, n. 2, p. 119-123, 2005.

HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometric using the sperm class analyzer. **Theriogenology**, v.66, p.996-1003, 2006.

HOLT, W. V.; HEAD, M. F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observation with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1086-1094, 1992.

HOUPALATHI R, LÓPEZ-FANDIÑO R, ANTON M, SCHADE R. **Bioactive egg compounds**. New York: Springer-Verlag, 296p., 2007.

HOWARD, T.W.; PACE, M.M. LAING, J.A.; MORGAN, W.J.B.; WAGNER, W.C. Seminal evaluations and artificial examination. In: **Fertility and infertility in veterinary practice**. 4.ed. London: Bailliere Tindall, 1988. p.39-51.

HUNES, R.; WEBB, G. Use of chichen or chukar egg yolk with two cryoprotectants for preservation of stallion sêmen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 62-63, 2006.



INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário estatístico do Brasil**. 2020. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/estatisticasnovoportaleconomicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=downloads>. Acesso em: 15 mar. 2020.

JEYENDRAN R, ACOSTA V, LAND S, COULAM C. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. **Fertil Steril**, v.90, p.1263-5, 2008.

JOLIVET P, BOULARD C, BEAUMAL V, CHARDOT T, ANTON M. Protein components of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **J Agric Food Chem**, v.54, p.4424-4429, 2006.

KACEM, O.; SIFER, C.; BARRAUD-LANGE, V.; DUCOT, B.; DE ZIEGLER, D.; POIROT, C.; WOLF, J. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. **Reproductive Biomedicine Online**, v.20, p.132-7, 2010.

KAROW, A. M. **Cryobiology for mammalian embryologists**, 2001. Disponível em <http://xytexinternational.com/pdf/cryobiology.pdf>. Acesso em: 04 out. 2011.

KASHIWAZAKI N, OKUDA Y, SEITA Y, HISAMATSU S, SONOKI S, SHINO M, MASAOKA T, INOMATA T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. **J Reprod Dev**, v.52, p.511-516, 2006.

KLINC P, RATH D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reprod Domest Anim.*, v.42, p.63-67, 2007.

KONIG, H. E.; LIEBICH, H. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. p. 413-428.

KONYALI, C.; TOMÁS, C.; BLANCH, E.; GOMEZ, E. A.; GRAHAM, J. K.; MOCE, E. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterolloaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. **Cryobiology**, v. 67, n. 2, p. 124-131, 2013.

KÜÇÜK, N.; AKSOY, M.; UÇAN, U.; AHMAD, E.; NASEER, Z.; CEYLAN, A.; SERIN, I. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. **Cryobiology**, v. 68, n. 3, p. 327-331, 2014.

KUKSIS A. Yolk lipids. **Bioch Biophys Acta**, v.1124, p.205-222, 1992.

KULAKSIZ, R.; ARI, U. Ç.; DASKIN, A.; UNER, A. G. The effect of different glycerol concentrations on freezability of semen from Angora, Kilis and Saanen goats. **Slovak Journal of Animal Science**, v. 46, n. 2, p. 39-44, 2013.

KUNKEL, D. ; NEVES, W.C. ; NUNES, J. F. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; CARDOSO, J. F. S. ; PAULA, N. R. O. Sexagem fetal por ultrassonografia em vacas Nelore inseminadas com sêmen rediluídos em ACP-111 no período seco. **Acta Veterinaria Brasilica (UFERSA)**, v. 8, p. 109-110, 2014.

LAVOLPE, M.; LORENZI, D.; GRECO, E.; NODAR, F.; SEDÓ, C. A. Relationship Between Sperm DNA Fragmentation and Nuclear Vacuoles. **JBRA Assisted Reproduction**, v.19, n.2, p.70-74, 2015.

LAVOR, C. T. B. ; NUNES, J. F. ; ANDRADE, J. M. ; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. ; SOBRAL, M. H. N. R. ; CÂMARA, S. R. ; SANTOS, B. M. B. ; SALGUEIRO, C. C. M. **Processo de colheita, diluição e conservação de sêmen aviário, diluente de sêmen aviário e, processo de fertilização**. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI11063696. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 20/09/2011.

LAVOR, C. T. B. ; CÂMARA, S. R. ; SANTOS, B. M. B. ; SALGUEIRO, C. C. M.; CASTRO, E. V. ; NUNES, J. F. Água de coco em pó como meio de conservação do sêmen de capotes (Numida meleagris). **Ciencia Animal**, v. 22, p. 73-75, 2012a.

LAVOR, C. T. B. ; CAMARA, S. R. ; SANTOS, B.M.B. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; GUEDES, M. I. F. ; NUNES, J. F. . Anormalidades em espermatozoides de galos preservados em água de coco em pó (ACP-108) em temperatura ambiente. **Ciencia Animal**, v. 22, p. 82-84, 2012b.

LAYEK, S. S.; MOHANTY, T. K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J. E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 172, p. 1–9, 2016.

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

LEITE-CASTRO, L. V. ; OLIVEIRA, F. C. E. ; NUNES, L. T. ; NUNES, J. F. ; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. . Criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com ACP® adicionado de gema de ovo. **Revista Brasileira De Engenharia De Pesca**, v. 6, p. 23-29, 2011.

LIMA, D. B. C. ; SILVA, T. F. P. ; AQUINO-CORTEZ, A. ; PINTO, J. N. ; CALDINI, B. N. ; MAGALHAES, F. F. ; SILVA, L. D. M. . Avaliação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos após recuperação com acp-117c ou tris, adição de gema e refrigeração a 4 °c por 24h. **Ciencia Animal**, v. 24, p. 3-10, 2014.

LIMA, D.B.C. ; SILVA, T.F.P. ; AQUINO-CORTEZ, A. ; PINTO, J.N. ; MAGALHÃES, F. F. ; CALDINI, B.N. ; SILVA, L.D.M. . Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia (Online)**, v. 68, p. 873-881, 2016.

LINHARES, F. R. A. ; NUNES, J. F. ; CARVALHO, M. A. M. ; LOPES, J. T. ; PINHEIRO, R. R. R. ; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. . Anormalidades em espermatozoides de carpa comum, *Cyprinus carpio*, fresco ou criopreservados em diluidor a base de água de coco em pó (ACP-104®). **Ciencia Animal**, v. 22, p. 671-674, 2012.

LINHARES, F. R. A.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. ; CARVALHO, M. A. M.; PINHEIRO, R. R. R. ; OLIVEIRA, F. C. E.; NUNES, J. F. . Cinética e morfologia de espermatozoides de carpa comum criopreservados em água de coco em pó ACP-104. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia (Online)**, v. 67, p. 1313-1320, 2015.

LINHARES, F.R.A. ; OLIVEIRA-ARAÚJO, M.S. ; NUNES, J.F. ; CARVALHO, M.A.M. ; CAMPELLO, C.C. ; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. . Efeito de vitaminas adicionadas ao diluente ACP-104 sobre a qualidade do sêmen criopreservado de carpa comum - *Cyprinus carpio* ). **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia**, v. 69, p. 980-988, 2017.

LUQUE, M.C.A. & S.N. BÁO. Structural and ultrastructural characterization of zebu (*Bos indicus*) spermatozoa. **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 33-38, 2006.

MACHADO, V. P.; NUNES, J. F. ; ARAÚJO, A. A. ; FERNÁNDEZ, D. R. P.; CORDEIRO, M. A. ; MEDEIROS, C. H. N. ; MEDEIROS, A. L. N.; MONTEIRO, A. W. U. . Fertilidade após inseminação artificial intra-cervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, p. 43-49, 2006.

MACHADO, V. P.; NUNES, J. F. ; MELO, C. C. S. ; CASTRO, E. V.; VIEIRA, R. J.; SALGUEIRO, C. C. M. . **Processo de re-diluição de sêmen bovino**. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10099409. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/12/2010.

MACHADO, V. P.; VIEIRA, R. J. ; NUNES, J. F. ; MOURA, A. A. A. N. . Proporção sexual após inseminação artificial utilizando sêmen bovino re-diluído em diluidor a base de água de coco em pó (ACP-111®). **Ciencia Animal**, v. 22, p. 254-256, 2012.

MADEIRA, V. L. H. ; MONTEIRO, C. L B. ; BARBOSA, C. C. ; JUCÁ, R. P. ; OLIVEIRA, A. C.; UCHOA, D. C. ; DA SILVA, L. D. M. . Efeito de diferentes protocolos de descongelação sobre o sêmen canino criopreservado em diluidor à base água de coco em pó (acp-106®). **Ciência Animal Brasileira (Online)**, v. 11, p. 845-852, 2010.

MAIA, M. S. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n. 2, p. 389-395, 2014.

MAIA, L. C. P. ; BRITO, B. F. ; SANTOS, B. M. B. ; CABRAL, L. A. R. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; MATTA, M. F. R. ; NUNES, J. F. . Aspectos econômicos e avaliação do período de viabilidade de espermatozoides ovino imunossesados e diluídos em meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-102c). **Acta Scientiae Veterinariae (Online)**, v. 48, p. 1740, 2020.

MAIA FILHO, S. P. ; BRITO, B. F. ; FARIAS, P. P. Q. ; ARAGAO, C. P. M. ; CAVALCANTE, J. M. M. ; NUNES, J. F. . Análise morfométrica de espermatozoides caprinos criopreservados com diluidor em meio à base da água de coco em pó (ACP-101c) ou TRIS. **Ciencia Animal**, v. 22, p. 299-302, 2012.

MANJUNATH, P; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **J Reprod Immunol**, v.53, p.109-119, 2002.

MANUAL para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

MARTINET, V.; SAULINIER, P.; BEAUMAL, V.; COURTHAUDON, J.L.; ANTON, M.. Surface properties of hen egg yolk low-density lipoproteins spread at the air-water interface. **Colloids Surf B: Biointerfaces**, v.31, p.185-194, 2003.

MARTINEZ-PARAMO, S., DIOGO, P., DINIS, M.T. HERRAEZ, M.P., SARASQUETE, C. AND CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, v. 77, p. 1129-1136, 2012.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A., ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R.. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

MATOS-BRITO, B. G.; LIMA, I. C. S.; PEREIRA, J. F.; BARBOZA, F. M.; LINARD, M. A. B.; AGUIAR, G. V.; CATUNDA, A. G. V.; MOURA, A. A. A.; NUNES, J.F.; CAMPOS, A. C. N. Effect of initial seminal plasma fructose concentration on goat semen storage at 5 °C. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 143-146, 2013.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v. 168, p. 939–949, 1970.

McPHAIL, D. B.; GOODMAN, B. A. Tris buffer a case for caution in its use for cooper containing systems. **Bioch. J.**, v. 221, p. 559-560, 1984.

MELO-MACIEL, M. A. P.; NUNES, J. F.; PINHEIRO, J. P. S.; NUNES, L. T. ; PINHEIRO, R. R. R. ; LOPES, J. T.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. . Sperm motility and velocities of Characiformes fishes in different times post-activation. **Semina-Ciencias Agrarias**, v. 36, p. 4023-4029, 2015.

MEMON, A. A.; WAHIND, H.; ROSIMA, Y.; GOH, Y. M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F. M. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. **Animal Reproduction Science**, v. 136, n. 1, p. 55-60, 2012.

MESQUITA, F. L. T. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; CORDEIRO, M. A. ; MELLO, M. M. C. ; PINTO, L. C. ; NUNES, J. F. . Fertilidade de cabras inseminadas artificialmente com sêmen diluído em água de coco em pó (ACP-101®). In: SEMANA UNIVERSITÁRIA - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 1., 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UECE, 2004. v. 9. p. 691.

MONTEIRO, A. W. U. ; MACHADO, V. P. ; PINHEIRO, J. H. T. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; CORDEIRO, M. A. ; CAVALCANTE, J. M. M. ; CAMPOS, A. C. N. ; NUNES, J. F. . Sêmen ovino diluído em TRIS e resfriado em solução de água de coco em pó. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 7., 2002, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UECE, 2002. v. 7. p. 300210.

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

MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H.; RONCOLETTA, M. **Manual de reprodução nas espécies domésticas: avaliação e empregabilidade do sêmen**, v. 1. São Paulo: Medvep, 2018.

MOREIRA L.L. **Avaliação Ecotoxicológica Preliminar De Efluentes Contendo Brometo De Etídeo**. 2010. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federa de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2010.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Kinematic definition of ram spermatozoa hyperactivation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.11, n.1, p.25–30, 1999.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403 - 39, 1997.

MOTA FILHO, A. C. ; TELES, C. H. A. ; JUCA, R. P. ; CARDOSO, J. F. S. ; UCHOA, D. C. ; CAMPELLO, C. C.; SILVA, A. R. ; SILVA, L. D. M. . Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. **Theriogenology**, v. 76, p. 1367-1372, 2011.

MOTA FILHO, A. C.; SILVA, H. V. R.; FREITAS, L. A. ; NUNES, T. G. P. ; ARAÚJO, A. A.; SILVA, L. D. M. . Refrigeração do epidídimo canino a 4°C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. **Pesquisa Veterinária Brasileira (Online)**, v. 33, p. 1155-1160, 2013.

MOTA FILHO, A. C. ; SILVA, H. V. R.; NUNES, T. G. P. ; SOUZA, M. B. ; FREITAS, L. A.; ARAÚJO, A. A.; SILVA, L. D. M. . Cryopreservation of canine epididymal sperm using ACP-106c and TRIS. **Cryobiology (Print)**, p. 17-21, 2014.

MOURA, C. S.; NUNES, A. K. S.; SILVA, B. S.; PEIXOTO, C. A.; SILVA A. R.; SILVA, S.V.; GERRA, M.M.P. Efeito da temperatura de descongelamento na integridade de espermatozoides criopreservados de cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 65, n. 4, ago. 2013.

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

NAING, S. W.; WAHID, H.; MOHD AZAM, K.; ROSNIMA Y.; ZUKI, A.B.; KAZHAL, S.; BUKAR, M.M.; THEIN M.; KYAW T.; SAN, M.M. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1, p. 23-28, 2010.

NARWADE, B. M.; MOHANTY, T. K.; BHAKAT, M.; RAHIM, A. Goat semen Cryopreservation using egg yolk and soya based extenders containing trehalose. **Indian Journal of Animal Science**, v.87, n.7, p.851-855, 2017.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells again damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, H. T. **Cryobiology**. London, New York : Academy press, 1966. p. 179-220.

NEVES, J. P.; NUNES, J. F.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; SALGUEIRO, C. C. M.; ALMEIDA, J. L. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES P. B. D.; FIGUEIREDO J. R.; FREITAS V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Ed. Roca. 2008. p. 395.

NEVES, M. M.; HENRY, M. Gema de ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.4, 0.209-14, 2012.

NUNES, J. F.; CORTEEL, J. M.; COMBARNOUS, Y.; BARIL, G. Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. **Reprod. Nutr. Dév.**, v. 22, p. 611-620, 1982.

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

NUNES, J. F. Coconut water as diluent for goat semen. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS, 4., 1987, Brasília. **Anais... Brasília**, 1987.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; PRISCILA, L. **Utilisation d'une substance active "JYP" presents dans l'eau de coco pour la conservation in vitro et La fertilité dès spermatozoïdes de mammifères.** [S.l: S.n.], 1994.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: SIMPOSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMESTICOS, 1., 1995. Fortaleza. **Anais... Fortaleza**, p. 53-63, 1995.

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

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

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

NUNES, J. F.; FIGUEIRÊDO, E. L. ; CORDEIRO, M. A.; SOUZA, P. T.; DIÓGENES FILHO, R. N.; VIEIRA, V. E.; SILVA FILHO, A. H. S. ; MESQUITA, F. L. T. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; FEITOSA, J. V. . Inseminação artificial de ovelhas da raça Santa Inês com sêmen diluído em água de coco in natura e em pó. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, p. 95-97, 2007.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. . Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 98, p. 176-184, 2011.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; SOUSA, M.S. Reprodução do macho caprino e inseminação artificial. In: SELAIVE-VILLARROEL, A.B.; GUIMARÃES, V.P. (Eds) **Produção de Caprinos no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2019. p. 231.

OBIKE, O. M., OKE, U. K. AND AZU, K. E. Comparison of egg quality traits of Pearl and Black varieties of guinea fowl in a Rain- Forest Zone of Nigeria. In: CONF. NIG. SOC. ANIM. PROD. 36., 2011. 2011, Nigeria. **Anais...** Nigeria. University of Abuja, 19-21, 2011.

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; CAVALCANTE, J. M. M. ; BRASIL, O. O. ; PARENTE, J. C. B. ; GONÇALVES, Raphael F. B. ; BATISTA, C. A. P. M. ; MOURA, A. A. A. N. ; ARAÚJO, A. A. . Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados com eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 862-869, 2009.

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M. ; BRASIL, O. O. ; MOURA, A. A. A. N. . Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 6, p. 1295-1302, 2011.

PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; DELL'QUA, J.; MONTEIRO, G. M. **Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino**. São Paulo: Botupharma, 2014.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209-222, 1992.

PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environmental International**, v. 33, p. 817-822, 2007.

PENITENTE-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, F. A.; JIMENEZ, C. R.; CARRASCAL, E.; DIAS, J. C. O.; OLIVEIRA, G. D.; SILVEIRA, C. O.; TORRES, C. A. A. Association of vitamin E with rapid thawing on goat semen. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

PERDRIX, A.; TRAVERS, A.; CHELLI, M.H.; ESCALIER, D.; DO REGO, J.L.; MILAZZO, J.P.; MOUSSETSIMÉON, N.; MACÉ, B.; RIVES, N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. **Human Reproduction**, v. 26, p.47-58, 2011.

PIVKO, J.; MAKAREVICH, A.V.; KUBOVIČOVÁ, E.; OSTRO, A.; HEGEDUSOVA, Z.; LOUDA, F. Histopathological alterations in the antral ovarian follicles in dairy cows with a tendency to emaciation. **Histol Histopathol.**, v. 27, p. 1211–1217, 2012.



PONTES, K. S. ; BRITO, B. F. ; MENEZES, E. S. B. ; SANTOS, B. M. B. ; FONSECA, L. S. ; RODRIGUES, F. R. N. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; NUNES, J. F. . Meio de preservação de sêmen ovino à base de água de coco em pó e extrato liofilizado de Aloe vera em protocolo de refrigeração a 4 °C por 48 horas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 439-440, 2016.

PURDY, P. H.: A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.

QIN, Y.; YANG, S.; XU, J.; XIA, C.; LI, X.; AN, L.; TIAN, J. Deep insemination with sex-sorted Cashmere goat sperm processed in the presence of antioxidants. **Reproduction in domestic animals**, v. 53, n. 1, p. 11-19, 2018.

QUAN, G. B.; HONG, Q. H.; LAN, Z. G.; YANG, H. Y.; WU, S. S. Comparison of the effect of various disaccharides on frozen goat spermatozoa. **Biopreserv Biobank**, v. 10, n. 5, p. 439-445, 2012.

REECE, W. O. **Anatomia e fisiologia dos animais domésticos**. 3. ed. São Paulo, editora: Roca, 2014.

REISINGER, R.E; ATKINSON, D.; PHOSPHOLIPID, cholesteryl ester microemulsions containing unesterified cholesterol: model systems for low-density lipoproteins. **J Lipid Res**, v.31, p.849-858, 1990.

RIBEIRO, B. R. C.; LARA, L. J. C.; BAIÃO, N. C. Efeito do nível de ácido linoleico na ração de matrizes pesadas sobre o peso, composição e eclosão dos ovos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 789-796, 2007.

RICARTE, A.R.F.; SILVA, A.R. Morfofisiologia da reprodução de caprinos: revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, Supl., p.S8-S13, 2010.

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

ROJAS, J.R., TRIEVEL, R.C., ZHOU, J., MO, Y., LI, X., BERGER, S.L., ALLIS, MARMORSTEIN, R. Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. **Nature**, v. 401, p. 93–98, 1999.

RONDON, R. M. M. ; RONDON, F. C. M. ; NUNES, J. F. ; ARAÚJO, A. A.; SOUSA, F. M.; CARVALHO, M. A. M.. Uso da água de coco em pó (ACP) em diferentes temperaturas como diluente de espermatozoides de capote (*Numida meleagris*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, p. 848-854, 2008.

ROOF, D. J.; BOWLEY, S.; PRICE, L. L.; MATSAS, D. J. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 412-420, 2012.

ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L.; BUSH, L. M.; WILDT, D. E.; BUSH, M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biologia Reprodução**, v.58, p.475-482, 1998.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, v. 179, p. 318-319, 1957.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p.996-1002, 2010.

SACK W.O ;DYCE K.M.; WENSING C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

SAKKAS, D., SELI; E.; MANICARDI, G. C.; NIJS, M.; OMBELET, W.; BIZZARO, D. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail. **Humam Fertility**, v.7, p. 99-103, 2004.

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

SALGUEIRO, C.C.M. **Evaluación de diferentes diluyentes en la congelación del semen caprino**. 2003. 135f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinarias) - Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2003.

SALGUEIRO, C. C. M.; GONDIM, J. M. ; NUNES, J. F. ; CORDEIRO, M. Albuquerque ; CAVALCANTE, J. M. M. ; MACHADO, V. P.; PINHEIRO, J. H. T. . Artificial insemination of ewes with semen diluted on powder coconut water (ACP-102®), cooled and stored for 48 hours at 4° C. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 2., 2004, Porto Seguro, **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v. 2. p. 374, 2004.

SALGUEIRO, C. C. M.; LIRA, D. T. ; BRASIL, A. F. ; NUNES, J. F.. Inseminação artificial de cabras com sêmen diluído e refrigerado a 4 °C em água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS. Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida (Cessou em 2007). **Revista de Ciências da Vida**, v. 26, p. 449-450, 2006.

SALGUEIRO, C.C.M; GONDIM, J.M.; NUNES, J.F. **Meio de conservação de células espermáticas e processo de obtenção de fração constituinte do meio de conservação de células espermáticas**. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI02035901. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 27/08/2002.

SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.. Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos. **Ciência Animal**, v. 22, p. 20-32, 2012.

SALLES, M.G.F. **Água de coco (Cocos Nucifera L.) in natura, sob a forma de gel e estabilizada como diluidor do sêmen caprino. 1989**. 145f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. ; VIEIRA, M. J. A. F. ; LEITE, L. V. ; OLIVEIRA, F. C. E. ; LINHARES, F. R. A. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; NUNES, J. F. . Meios de congelamento para a conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, v. 22, p. 255-268, 2012.

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

SAMUELSON, DON A. **Tratado de histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p.406-409.

SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESO, M.C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; DELGADILLO, J. A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. **Anim. Reprod. Sci.**, v.181, p.141-150, 2017.

SANTOS, B. M. B. ; MELO, C. C. S. ; ANTUNES, L. P. ; SALGUEIRO, C. C. M.; AGUIAR, G. V. ; NUNES, J. F.. Parâmetros cinéticos dos espermatozoides caprinos diluídos em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) adicionado de Aloe vera. **Ciência Animal**, v. 22, p. 435-438, 2012.

SHAFIEI, M.; FOROUZANFAR, M.; HOSSEINI, S. M.; ESFAHANI, M. H. N.. The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of postthawed goat semen. **Theriogenology**, v. 83, n. 8, p. 1321–1327, 2015.

SHAPOSHNIKOV, S.; FRENGEN, E.; COLLINS, A.R.. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization-a review. **Mutagenesis**, v.24, p.383-389, 2009.

SILVA, A.R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos**. 2005. 165f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2005.

SILVA, A. F.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA F. A.; TORRES, C. A. A.; HASS, G. T. S.; NASCIMENTO, V. A. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 452-456, 2006.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. . Comparação entre a água de coco em pó (ACP) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 767-774, 2006.

SILVA, M.C. ; SNOECK, P.P.N. ; BECKER-SILVA. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos resfriados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008. Granada. **Anais...** Grtamado: CONBRAVET, 2008. p. R1251-1.

SILVA, R.A.C.; SOUZA, T.O.; DIAS, L.P.; ANDRADE, T.J.A.S. Ação do extrato metanólico da Moringa oleifera sobre o crescimento micelial de fitopatógenos. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE E NORDESTE DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 4., 2009, Belém-PA. **Anais...** Belém: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Inovação Tecnológica, 2009.

SILVA, E. C. B. **Efeito da adição de diferentes crioprotetores e antioxidantes na criopreservação do sêmen de ovinos da raça Santa Inês**. 2010. 132f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 370-384, 2011.

SILVA, M. A.; PEIXOTO, G. C. X.; CASTELO, T. S.; LIMA, G. L.; SILV, A. M.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. **Cryobiology**, v. 67, n. 1, p. 50-55, 2013.

SILVA, J.L. **Efeito da época do ano sobre as características do sêmen criopreservado de caprinos Azul, Canindé e Moxotó nas estações seca e chuvosa**. 2017. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, , 2017.

SILVA, H. V. R. ; NUNES, T. G. P.; MOTA FILHO, A. C. ; PINTO, J.N. ; SILVA, A. R.; SILVA, L.D.M. . Adição de hidroxitolueno butilado (bht) no diluidor acp-106c para congelação de sêmen canino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. 1-9, 2018.

SILVEIRA, E. C. ; ARAÚJO, E. D. ; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.. **Desenvolvimento de meio de cultura à base de água de coco em pó no processo de diluição e criopreservação de sêmen humano**. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150194579. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 13/08/2015.

SIMÕES, R. **Influência da fragmentação de DNA espermático na produção in vitro de embriões bovinos**. 2010. 106f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2010.

SINGH, B. K. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda**. São Paulo: Andrei Editora LTDA, 2006. 331p.

SINGH, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K. Effect of cyoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. **Theriogenology**, v.43, p.1047-1053, 1995.

SIRVENTE, H.; BEAUMAL, V.; GAILLARD, C.; BIALEK, L.; HAMM, D.; ANTON M. Structuring and functionalization of dispersions containing egg yolk, plasma and granules induced by mechanical treatments. **J Agric Food Chem**, v.55, p.9537-9544, 2007.

SNOECK, P.P.N. **Aspectos de criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluído, curvas de congelamento e fertilidade**. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal do Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

SOARES, M. P.; ROSSI, C. A. R.; MEZZALIRA, A.; CECIM, M. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p.649-655, ago. 2002.

SOARES, A. T.; SILVA, S. V.; ALMEIDA, F. C.; LEMOS, P. F. B. A.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C. A. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutatona reduzida. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 1991-1997, 2011.

SOARES, J.M.; BELETTI, M.E. Avaliação da morfologia e da compactação cromatínica em espermatozoides de galinha (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) através de microscopia eletrônica de transmissão. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.43, p.554-560, 2006b.

SOBREIRA NETO, J. A. Avaliação in vitro do sêmen equino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia e Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SONG, X. M.; LU, S. S.; WANG, M.. Addition of glutathione to semen extender during sperm sorting can improving in vitro embryonic development and in vivo fertility in buffalo. **J. Anim. Vet. Advances**, v. 11, n. 23, p. 4482-4488, 2012.

SOUSA, N.M.; TEIXEIRA, M.D.A.; OLIVEIRA, L.F. Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidor do sêmen ovino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 23., 1994. Olinda, **Anais...** Olinda: [s.n.], 1994,

SOUSA RCS, COIMBRA JSR, ROJAS EEG, MINIM LA, OLIVEIRA FC, MINIM VPR. Effect of pH and salt concentration on the solubility and density of egg yolk and plasma egg yolk. **Food Sci Technol**, v.40, p.1253-1258, 2007.

SOUSA, M. S. ; BARÇANTE, F. P. S. ; SILVA, P. O. ; SALGUEIRO, C. C. M.; CARDOSO, J. F. S. ; PAULA, N. R. O.. Uso de sêmen ovino resfriado em ACP102® contendo gema de ovo no estado do Piauí: resultados preliminares. **Ciência Animal**, v. 22, p. 482-485, 2012.

SOUSA, M. S.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CÂMARA, T. S.; MACHADO, A. A. C. ; PESSOA, R. H. Paula ; NEGUEIROS, N. A. B.. Protocolos de sincronização do estro e ovulação seguidos de inseminação artificial em tempo fixo em ovelhas deslanadas: Resultados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 452-453, 2016.

SOUSA, M. S. ; BRITO, B. F. ; CABRAL, L. A. R. ; NEGUEIROS, N. A. B.; PONTES, K. S. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; NUNES, J. F. . Criopreservação do sêmen de caprinos em diluidores alternativos e análise da viabilidade. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 56478-56485, 2020.

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

SOUZA, P. T. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; GONDIM, J. M. ; CAVALCANTE, J. M. M. ; CORDEIRO, M. A. ; NUNES, J. F. . Avaliação do efeito in vivo do diluente ACP-101® sobre a fertilidade de cabras inseminadas artificialmente com o sêmen resfriado a 4° C e conservado por 24 ou 48 horas. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 1., 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza. UECE, 2004. v. 9. p. 1456.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.E.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TONER R., CRAVALHO E.G. & KAREL M. Cellular response of mouse oocytes to freezing stress: prediction of intracellular ice formation. **J. Biomech. Eng.**, v. 115, p. 169–174, 1993.

TONIOLLI, R. Estudo das características "in vitro" do sêmen caprino de raças nativas do Nordeste brasileiro diluído em água de coco sob a forma "in natura", estabilizada e de gel. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.13, p.209-220, 1989a.

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

TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G.H. ; FRANCESQUINI, P.H. ; MORATO, F.M.A.C. . Uso do diluente água de coco em pó (ACP-103®) na conservação prolongada do sêmen do varrão: avaliação in vitro e in vivo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1072-1079, 2010.

TONIOLLI, R.; TONIOLO, G.H. ; FRANCESQUINI, P.H. ; Morato, F.M.A.C. . Qualidade morfo-funcional do espermatozóide suíno conservado nos diluentes ACP-103® e BTS. **Ciência Animal**, v. 22, p. 44-50, 2012.

TONIOLLI, R.; BARROS, T.B. ; TONIOLLI, L. S. ; GUIMARAES, D. B. ; DIAS, A.V. ; CANTANHÊDE, L.F. ; ARAÚJO, L.R.S. ; QUEVEDO FILHO, I.B. . Qualidade espermática do ejaculado suíno conservado a 5 oC no diluente ACP-103 associado à gema de ovo. **Ciência Animal**, v. 23, p. 45-57, 2013.

UCHOA, D. C., CARDOSO, R. C. S., SILVA, L. D. M. Inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer com diferentes diluidores de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim., Supl.**, n.5, p.150-152, 2002.

UCHÔA, D. C. ; SILVA, L. D. M. ; NUNES, J. F. ; SALGUEIRO, C. C. M. **Processo de diluição e preservação de sêmen de canídeos**. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI11000325. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 06/01/2011.

UCHOA, D. C. ; DA SILVA, T. F. P. ; CARDOSO, J. F. S.; FILHO, A. C. M. ; JUCÁ, R. P.; SILVA, A. R. ; MACHADO DA SILVA, L. D.; SILVA, L. D. M.. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). **Theriogenology**, v. 77, p. 1959-1963, 2012a.

UCHOA, D. C.; SILVA, T. F. P.; MOTA FILHO, A. C. ; SILVA, L. D. M. . Intravaginal Artificial Insemination in Bitches Using Frozen/Thawed Semen after Dilution in Powdered Coconut Water (ACP-106c). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 289-292, 2012b.

VALENTE, S. S.; PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; MARQUES, C. C.; VASQUES, M. I.; PEREIRA, M. V. C. S.; HORTA, A. E. M.; BARBAS, J. P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v.117, p.74-77, 2010.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.149-179, 2002.

VIVEIROS-LEAL, A. T. M. ; VIVEIROS-LEAL, A. T. M.; MARIA, A. N. ; ÓRFÃO, L. H. ; CARVALHO, M. A. M.; NUNES, J. F. . Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. **Cybium**, Paris, v. 3, p. 215, 2008.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.481-492, 2000.

WATT, B.; MERRILL, A. L. **Composition of foods**: raw, processed, prepared. Washington: Consumer and Food Economics Research Division, 1963. 198p.

WILHEM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effect of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 33, p. 320-329, 1996.

YODMINGKWAN, P.; GUNTAPROM, S.; JAKSAMRIT, J.; LERTCHUNHAKIAT, K. Effects of Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 11, p. 125–130, 2016.

ZAIA, M. G. **Efeito da Mentha peperita L. durante a infecção experimental por Schistosoma mansoni**. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

ZORZETTO, M. F. ; MARTIN, I. ; SANCLER-SILVA, Y. F. R. ; ZOCCA, S. ; FREITAS-DELL'AQUA, C. P. ; PAPA, F. O. ; RAMOS, A. A. ; NUNES, J. F. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; OBA, E. . Comparison of three different extenders on Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) semen freezability. *Andrologia*, v. e12830, p. e12830-6, 2017.





## ANEXO A – APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “BIOPROSPECÇÃO DE CRIOPROTETORES ALTERNATIVOS PARA CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO”. Protocolo número 07614/2018, sob responsabilidade de *Ney Rômulo de Oliveira Paula*, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **DEFERIDO**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

ESPÉCIE	LINHAGEM	SEXO	IDADE	PESO	VIGÊNCIA DO PROJETO	Nº DE ANIMAIS
CAPRINO	SPRD	MACHO+FÊMEA	4 ANOS	45KG	02 ANOS	125

TERESINA, 20 DE JUNHO DE 2018

*Antônio Luiz Martins Maia Filho*

Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho  
Coordenador CEUA-UESPI  
port. 134

## ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO I

01/11/2021 09:38

ScholarOne Manuscripts

 Animal Reproduction

 Home

 Author

# Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

### Submitted to

Animal Reproduction

### Manuscript ID

AR-2021-0114

### Title

Assessment of coconut water added to Numida meleagris egg yolk as cryoprotectant for goat sêmen

### Authors

de Macêdo, Laércio  
 de Araújo Texeira, Leticia Soares  
 de Castro e Braga, Clarissa  
 de Paiva Porfirio, Kenney  
 da Silveira Costa, Sara Camila  
 Silva, Louis Henrique Miyauchi  
 Nascimento, Wcleuden Matias  
 dos Santos Silva, Francisca Kelly  
 Bandeira, Nildene Silva Andrade  
 Vieira, Rômulo José  
 Barradas Mineiro, Ana Lys Bezerra  
 de Mello Salgueiro, Cristiane Clemente  
 Nunes, José Ferreira  
 de Fátima Saraiva Cardoso, Janaina  
 DE OLIVEIRA PAULA, NEY RÔMULO

### Date Submitted

01-Nov-2021

<https://mc04.manuscriptcentral.com/ar-scielo>

1/2

01/11/2021 09:38

ScholarOne Manuscripts

Author Dashboard

## ANEXO C – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO II

Research, Society and Development, v. 10, n. 14, e265101422064, 2021  
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i14.22064>

### **Avaliação da viabilidade espermática de sêmen caprino criopreservado em meio ACP-101c e TRIS acrescido de gema de ovo de *Numida meleagris***

**Evaluation of sperm viability of cryopreserved goat semen in ACP-101c and TRIS medium plus *Numida meleagris* egg yolk**

**Evaluación de la viabilidad espermática de semen de cabra criopreservado en medio ACP-101c y TRIS más yema de huevo *Numida meleagris***

Recebido: 20/10/2021 | Revisado: 28/10/2021 | Aceito: 29/10/2021 | Publicado: 01/11/2021

**Laércio Fontinele Bandeira de Macêdo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5417-3033>  
Universidade Estadual do Ceará, Brasil  
E-mail: laerciofbj@hotmail.com

**Leticia Soares de Araújo Teixeira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1630-6904>  
Universidade Federal do Piauí, Brasil  
E-mail: leticiasoaateixeira@gmail.com

**Wcleuden Matias Nascimento**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0264-2942>  
Universidade Estadual do Ceará, Brasil  
E-mail: wcleudemmatias@hotmail.com

**Clarissa de Castro e Braga**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2658-9111>  
Universidade Federal do Piauí, Brasil  
E-mail: clah\_1995@hotmail.com

**Kenney de Paiva Porfírio**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5195-0434>  
Universidade Federal do Piauí, Brasil  
E-mail: kenney@ufpi.edu.br

**Francisca Kelly dos Santos Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2084-584X>  
Universidade Federal do Piauí, Brasil  
E-mail: fkelly2209@gmail.com

**Sara Camila da Silveira Costa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0381-0116>  
Universidade Federal do Piauí, Brasil  
E-mail: saracostapink@hotmail.com

**Louis Henrique Miyauchi Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5653-2263>  
Universidade Federal do Piauí, Brasil  
E-mail: louishms@hotmail.com.br

**Rômulo José Vieira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4154-3808>  
Universidade Federal do Piauí, Brasil  
E-mail: rvieirasb@yahoo.com.br

**Cristiane Clemente de Mello Salgueiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0071-4030>  
Universidade Estadual do Ceará, Brasil  
E-mail: cristiane.mello@uece.br

**José Ferreira Nunes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1189-0937>  
Universidade Estadual do Ceará, Brasil  
E-mail: nunesuece@gmail.com

**Nildene Silva Andradre Bandeira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4723-8983>  
Faculdade Santo Agostinho, Brasil  
E-mail: mildeneandrade@hotmail.com

**Fabricio Pires de Moura do Amaral**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6187-2206>  
Universidade Estadual do Piauí, Brasil  
E-mail: fabricio34amaral@gmail.com