

Comparação entre a água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães

Alexandre Rodrigues SILVA¹
Rita de Cássia Soares
CARDOSO¹
Lúcia Daniel Machado da
SILVA¹

1 - Laboratório de Reprodução de Carnívoros – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza - CE

Correspondência para:
Alexandre Rodrigues SILVA
Rua Aracati, 69 Benfica
60020-240 - Fortaleza-CE
legio2000@yahoo.com

Recebido para publicação: 18/05/2005
Aprovado para publicação: 13/02/2006

Resumo

O presente trabalho comparou a água de coco em pó (ACP®) com o diluidor Tris na criopreservação do sêmen canino através da avaliação clássica e do teste de termorresistência. Cinco reprodutores caninos foram submetidos a duas coletas de sêmen através de manipulação digital. As frações espermáticas foram avaliadas quanto à sua coloração, volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática. As amostras de sêmen foram divididas em duas alíquotas: a primeira foi diluída em Tris e a segunda em ACP®. Ambos os diluidores continham 20% de gema de ovo. As amostras foram refrigeradas, adicionadas de glicerol (6%), envasadas em palhetas de 0,25mL, criopreservadas em vapores de nitrogênio, e finalmente armazenadas em nitrogênio líquido. Após uma semana, foi realizada a descongelação a 38°C por 1 min em banho-maria, sendo realizadas novas avaliações de motilidade, vigor e morfologia espermática. As amostras foram mantidas a 38°C no banho-maria e avaliadas aos 15 e 30 min após descongelação. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois diluidores no decorrer dos procedimentos de criopreservação e descongelação, bem como durante o teste de termorresistência, em relação às características avaliadas. O Tris e o ACP® foram eficientes em conservar 50% de espermatozóides móveis e 70% de espermatozóides morfolologicamente normais após a descongelação. Assim, o ACP® pode ser utilizado como diluidor alternativo para a criopreservação do sêmen canino.

Palavras-chave:
Criopreservação.
Sêmen.
Cão.
Tris.
Água de coco.

Introdução

Atualmente, a criopreservação se configura como uma importante ferramenta para a conservação do sêmen de reprodutores valiosos de qualquer espécie animal, incluindo o cão. Por esse motivo, a pesquisa científica tem tentado aprimorar os protocolos para a criopreservação de sêmen canino através do uso de diferentes taxas de congelamento e descongelamento, e um grande número de crioprotetores e diluidores, como a lactose, o Pipes, e o Tris¹. Este último é o diluidor mais utilizado para a criopreservação do sêmen canino. Ele preserva a energia espermática através da redução do índice de frutólise celular e sua atividade

tamponante promove a remoção dos íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo da célula². Alguns pesquisadores têm desenvolvido diluidores alternativos de baixo custo, práticos e eficientes. Já há alguns anos, têm sido observados bons resultados na criopreservação do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de água de coco *in natura*^{3,4}. No entanto, esses diluidores apresentam desvantagens, como a baixa disponibilidade dos frutos com características ideais para a sua fabricação e a impossibilidade de conservação por longo período da água de coco *in natura*. Ademais, a constituição bioquímica de um fruto pode apresentar pequenas variações em relação aos demais, o que pode diretamente influenciar a ação

conservativa do diluidor. Diante dessa problemática, novas pesquisas^{5,6,7} foram conduzidas no intuito de desenvolver a água de coco sob a forma de pó (ACP® - ACP Tecnologia, Brasil), a qual apresenta os mesmos constituintes bioquímicos da forma *in natura*, porém é padronizada e mais eficazmente conservada, o que facilita sua comercialização para regiões onde o fruto não existe.

No intuito de comprovar a eficiência do ACP® para uso como diluidor na criopreservação do sêmen de cães, o presente trabalho teve como objetivo compará-lo com o diluidor padrão Tris, por meio da avaliação clássica e do teste de termorresistência no sêmen canino após descongelamento.

Materiais e Métodos

Animais

Cinco cães pertencentes a *canis* particulares foram selecionados para uso no trabalho, sendo um Fila Brasileiro, um Doberman, um American Staffordshire Terrier, um Rottweiler e um Boxer, com idade variando de 1,5 a 6 anos. Todos os animais foram mantidos em boxes individuais e alimentados uma vez ao dia com ração comercial, recebendo água *ad libitum*, no decorrer do experimento.

Coleta de sêmen e avaliação

Cada cão foi submetido à coleta de dois ejaculados, com intervalo de uma semana, através da técnica de manipulação digital do bulbo peniano⁸. Os ejaculados foram coletados em tubos graduados acoplados a um funil, e as frações seminais foram separadas de acordo com a modificação da sua coloração⁸. As frações espermáticas foram avaliadas macroscopicamente quanto ao volume e cor. Em seguida, procedeu-se a avaliação microscópica (100x) da motilidade e do vigor espermáticos. Para a análise da morfologia espermática⁸ foram confeccionados esfregaços espermáticos em lâminas coradas com eosina-nigrosina, tendo

sido contadas 200 células por lâmina sob avaliação microscópica (1000x). A concentração espermática foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer⁸. Apenas aquelas amostras que apresentaram volume $\geq 0,06$ mL, concentração $\geq 200 \times 10^6$ espermatozoides/mL, motilidade espermática $\geq 80\%$ e vigor ≥ 4 foram utilizadas no experimento.

Diluidores

Foram testados dois diluidores. O primeiro deles, à base de tampão Tris, foi constituído por 3,028g de Tris-hidroximetilaminometano, 1,78g de ácido cítrico monohidratado e 1,25g de D-frutose dissolvidos em 100mL de água ultrapura¹⁸. A osmolaridade deste diluidor foi de 305 mOsm/L e o pH 6,6. O segundo diluidor consistia no ACP®, constituído por 12g de água de coco em pó, obtida através de um forte processo de vaporização conhecido como "Spray Dryer", dissolvida em 50mL de água ultrapura e 50mL de solução de citrato de sódio monossódico a 1%⁵. A osmolaridade desse diluidor foi de 294mOsm/L com pH 6,6. Para ambos, foi feita a substituição de 20% da solução por gema de ovo. Após esse procedimento, os diluidores foram divididos em duas porções I e II, sendo que a porção I não possuía glicerol, e a porção II continha 12% de glicerol.

Processamento do sêmen

Durante a análise inicial do sêmen, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente (27°C) por 10 min e, em seguida, divididas em duas alíquotas, onde uma delas foi diluída em Tris e a outra em ACP®, em uma proporção final de uma parte de sêmen para uma parte de diluidor (1:1)^{3,9}. Inicialmente, a porção I de ambos diluidores foi adicionada às alíquotas de sêmen à temperatura ambiente. Todas as amostras foram colocadas em uma caixa de isopor contendo gelo reciclável por 40 min, onde atingiram a temperatura de 15°C, em uma velocidade de -0,30°C/min. Em seguida, as

amostras foram repassadas para um refrigerador por mais 30 min, onde atingiram 4°C, a -0,37°C/min. Nesse momento, foi feita a adição da porção II do diluidor, promovendo uma concentração final de 6% de glicerol para ambos diluidores. As amostras foram reavaliadas quanto à sua motilidade e vigor, e envasadas em palhetas plásticas de 0,25mL. As palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio em uma rampa de congelação localizada a 5cm de distância do nitrogênio líquido, durante cinco minutos, atingindo temperaturas próximas a -70°C. Finalmente, as palhetas foram acondicionadas em botijão criobiológico a -196°C. Após uma semana, procedeu-se a descongelação do sêmen, através da imersão das palhetas em banho-maria a 38°C por 1 min, realizando-se novas avaliações de motilidade, vigor e morfologia espermática. Para o teste de termorresistência, as amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria, sendo feitas novas avaliações de motilidade e vigor espermáticos aos 15 e 30 min após descongelação.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e analisados pelo programa Statview 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NY, USA). Os dados de motilidade e morfologia espermática foram transformados em Arco-Seno. As diferenças entre as características seminais dos animais foram

avaliadas através do teste de Kruskal-Wallis. O efeito dos diluidores sobre a motilidade e morfologia espermática, bem como os efeitos do período de incubação após descongelação sobre a motilidade, foram avaliados através do teste t de Student. Os mesmos efeitos sobre o vigor espermático foram avaliados através do teste de Mann-Whitney.

Resultados e discussão

O sêmen fresco dos cães utilizados no experimento apresentou coloração branca-leitosa. Os resultados de volume da segunda fração, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermáticos no sêmen fresco estão apresentados na Tabela. 1. Não foram verificadas diferenças significativas quanto às características seminais entre os cães, mostrando que eles compunham uma população homogênea ($P > 0,05$). Além disso, os valores estavam dentro da variação normal descrita para a espécie canina^{8,10}.

Nas figuras 01 e 02, observa-se o declínio na motilidade e vigor espermático, respectivamente, a cada etapa de avaliação durante o procedimento de criopreservação, o qual não foi estatisticamente significativo até a adição do glicerol ($P > 0,05$). No entanto, à descongelação, observou-se uma queda significativa nos valores para ambas características no uso dos dois diluidores ($P < 0,01$), os quais não diferiram entre si ($P > 0,05$). Diversos trabalhos sobre

Tabela 1 - Características dos ejaculados (n = 10) dos cães utilizados no experimento (Média ± DP). Fortaleza, 2005

Cão	Volume da 2ª fração (mL)	Concentração ($\times 10^6$ espermatozóide/mL)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Morfologia normal (%)
1	2,2 ± 2,2	1370,0 ± 650,5	95,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	80,3 ± 3,2
2	1,6 ± 0,8	885,0 ± 502,1	92,5 ± 3,5	5,0 ± 0,0	78,3 ± 6,7
3	0,9 ± 0,7	1250,0 ± 70,7	95,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	79,5 ± 11,3
4	0,5 ± 0,1	520,0 ± 113,1	97,5 ± 3,5	5,0 ± 0,0	76,0 ± 0,0
5	1,9 ± 0,7	2760,0 ± 28,3	99,0 ± 1,4	5,0 ± 0,0	79,8 ± 1,1
Total	1,4 ± 1,0	1357,0 ± 849,9	95,8 ± 2,9	5,0 ± 0,0	78,8 ± 4,8

($P > 0,05$).

criopreservação de sêmen canino demonstram essa redução de motilidade após a descongelação no uso de diversos diluidores^{2,3,11,12}. Esse declínio corresponde à resposta da célula espermática às injúrias sofridas durante o processamento, como alterações físico-químicas que levam à ruptura da membrana plasmática e à remoção de importantes proteínas de membrana, alterações na estrutura lipídica da bi-camada lipídico-protéica da membrana plasmática, alterações osmóticas e rearranjos iônicos oriundos da adição do crioprotetor¹³.

Neste estudo, foram observados 56,5% e 51,5% de espermatozoides móveis após a descongelação no uso dos diluidores Tris e ACP®, respectivamente. Esses valores encontram-se dentro da média descrita por outros trabalhos no uso dos diluidores Tris^{9,11} e água de coco *in natura*³ ou em pó⁵. O vigor espermático é uma característica que descreve a qualidade da motilidade espermática, estando intimamente ligado à mesma⁹. No presente trabalho, ambos os diluidores foram eficientes ao conservar o vigor espermático em torno de 4,0, correspondendo a espermatozoides com movimento progressivo contínuo.

A Tabela. 2 mostra os resultados do teste de termorresistência após a descongelação. Verifica-se que os valores referentes à motilidade e ao vigor espermáticos mantiveram-se constantes até os 15 minutos, mas declinaram significativamente aos 30 minutos após a descongelação, no uso de ambos os diluidores ($P < 0,01$). Alguns

autores têm conservado a longevidade espermática após descongelação por até oito horas, através da incorporação de produtos derivados do Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), como as pastas Equex STM e Orvus^{11,12}. Entretanto, segundo Tsutsui et al.¹⁴, o espermatozoide canino é capaz de atingir a tuba uterina, local onde ocorrerá a fertilização, dentro de até três minutos após sua deposição intravaginal. Sendo assim, uma correta identificação do momento da ovulação da cadela permitiria a obtenção de sucesso no uso de sêmen com menor longevidade *in vitro*. Além disso, Ström, Rota e Linde-Forsberg et al.¹⁵ sugerem que baixa longevidade espermática não está necessariamente associada com baixa fertilidade. Esses autores obtiveram 74% de espermatozoides móveis imediatamente após a descongelação, mas esses valores declinaram para 20% após 60 minutos a 37°C e, ainda assim, obtiveram 85% de fertilidade no uso desse sêmen após deposição intra-uterina.

Uma redução significativa foi observada no número de espermatozoides morfológicamente normais, quando comparados os resultados do sêmen fresco com o descongelado ($P < 0,01$), conforme observado na Tabela. 3. Entretanto, não foram evidenciadas diferenças entre os dois diluidores ($P > 0,05$). Segundo Oettlé¹⁰, um declínio significativo nas taxas de concepção seria observado caso fossem utilizadas amostras de sêmen apresentando valores inferiores a 60% de espermatozoides normais. Ambos os diluidores utilizados no

Tabela 2 - Motilidade e vigor espermáticos no sêmen canino diluído em Tris ou ACP® após descongelação, mantido a 38°C por 30 minutos. Fortaleza, 2005

Avaliações após descongelação (min)	Motilidade espermática (%)		Vigor espermático (0-5)	
	Tris	ACP®	Tris	ACP®
0	56,5 ± 12,9 ^{Aa}	51,5 ± 14,2 ^{Aa}	4,0 ± 0,3 ^{Aa}	3,9 ± 0,3 ^{Aa}
15	43,6 ± 15,8 ^{Aab}	32,9 ± 17,3 ^{Aab}	3,6 ± 0,8 ^{Aab}	3,1 ± 1,2 ^{Aab}
30	28,6 ± 16,8 ^{Ab}	19,3 ± 14,0 ^{Ab}	2,7 ± 1,4 ^{Ab}	2,2 ± 1,3 ^{Ab}

Valores seguidos de letras maiúsculas indicam diferenças entre colunas; valores seguidos de letras minúsculas indicam diferenças entre linhas ($P < 0,01$)

presente trabalho permitiram uma boa conservação da morfologia espermática, visto que ambos apresentaram valores em torno de 70% de espermatozoides morfológicamente normais após a descongelação. O destacamento de cabeças de espermatozoides foi o defeito morfológico mais visualizado no sêmen fresco e em ambos os tratamentos ($P < 0,01$). Nesse trabalho, os esfregaços de sêmen foram confeccionados através do uso de *swabs* repassados sobre a lâmina. Esse método parece não ser eficiente, uma vez que pode promover o destacamento das cabeças espermáticas, aumentando assim a proporção de defeitos. Em adição, as qualidades tintoriais do corante utilizado nesse trabalho não permitiram uma clara

distinção entre espermatozoides vivos e mortos.

Observou-se que ambos os diluidores foram eficientes na manutenção da qualidade espermática após os procedimentos de criopreservação e descongelação. O Tris é um diluidor largamente utilizado não apenas para a tecnologia do sêmen de cães^{2,9}, mas também de bovinos¹⁶, bubalinos¹⁷, caprinos¹⁸, felinos¹⁹, e humanos²⁰. Já o ACP[®] surge como uma nova alternativa para uso na tecnologia de sêmen, permitindo o uso do diluidor à base de água de coco mesmo em regiões onde o fruto da *Cocos nucifera* não exista naturalmente. Este diluidor é composto por proteínas, sais, açúcares e minerais²¹, sendo que sua fração ativa foi identificada como um fitormônio promotor de

Tabela 3 - Morfologia espermática observada no sêmen canino fresco e descongelado, utilizando-se os diluidores Tris e ACP[®]. Fortaleza, 2005

	Morfologia espermática (%)		
	Fresco	Tris	ACP [®]
Espermatozóide normal	78,4 ± 4,1 ^A	72,6 ± 5,7 ^B	69,7 ± 5,6 ^B
Defeitos de cabeça			
Cabeça destacada	11,5 ± 3,4	12,8 ± 2,4	11,5 ± 6,2
Cabeça dupla	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0
Cabeça dobrada	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,5
Macrocefalia	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2
Microcefalia	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2
Cabeça piriforme	0,3 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,5 ± 0,7
Destacamento de acrossoma			
Acrossoma edemaciado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,3
Defeitos de peça intermediária			
Espessamento			
PI dobrada	2,3 ± 1,8	1,5 ± 0,9	3,2 ± 2,2
Gota proximal	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Gota distal	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Inserção abaxial	0,3 ± 0,4	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2
Defeitos de cauda			
Cauda quebrada	2,1 ± 0,8 ^A	4,7 ± 2,5 ^B	4,3 ± 1,3 ^B
Cauda enrolada	4,3 ± 1,5 ^A	7,2 ± 2,3 ^B	8,4 ± 2,9 ^B
Cauda fortemente enrolada	0,5 ± 1,2	0,7 ± 1,2	0,6 ± 1,0
Cauda dupla	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0

Valores seguidos de diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas ($P < 0,01$)

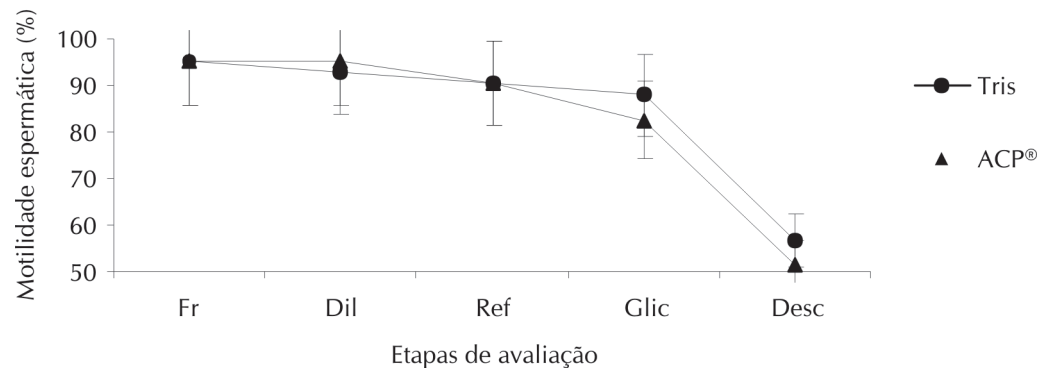


Figura 1-Motilidade espermática do sêmen canino fresco (Fr), diluído (Dil), refrigerado (Ref), glicerolizado (Glic) e descongelado (Desc), submetido à diluição com Tris ou ACP®. (Não foram observadas diferenças entre os diluidores ($P > 0,05$))

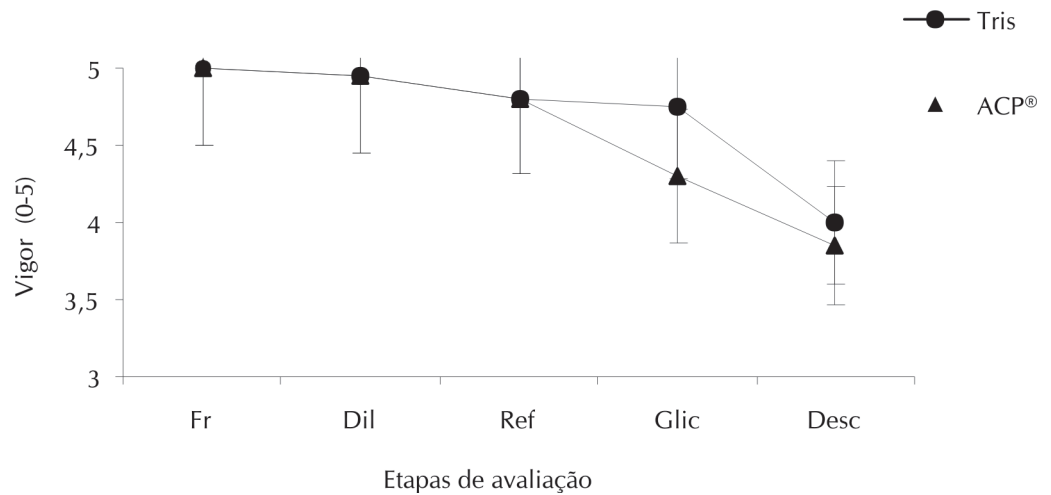


Figura 2-Vigor espermático no sêmen canino fresco (Fr), diluído (Dil), refrigerado (Ref), glicerolizado (Glic) e descongelado, submetido à diluição com Tris ou ACP®. (Não foram observadas diferenças entre os diluidores ($P > 0,05$))

crescimento celular, denominado ácido 3-indol-acético²². A atividade do ACP® na conservação espermática já foi comprovada em caprinos⁶ e equinos⁷. Com relação aos cães, resultados iniciais comparando a água de coco na forma *in natura* e em pó, mostraram que ambas são similarmente eficientes na criopreservação⁵ e na refrigeração²³ de sêmen canino. Além disso, estudos *in vivo* mostraram que o uso do ACP® como diluidor para o sêmen canino a fresco promove o nascimento de um maior número de filhotes do sexo feminino do que masculino²⁴. Ao se utilizar a água de coco *in natura* como diluidor de sêmen

canino, utiliza-se convencionalmente uma proporção de 20% de gema de ovo³. Porém, durante o presente estudo, observou-se que não existe uma perfeita homogeneização entre o ACP® e a gema. Sendo assim, é sugestivo que trabalhos futuros definam uma menor proporção de gema a ser adicionada ao ACP®, sendo inclusive talvez necessária a centrifugação do diluidor antes de seu uso.

Em conclusão, os diluidores Tris e ACP® mostraram-se eficientes para uso na criopreservação do sêmen de cães, não apresentando diferenças quanto à conservação da qualidade seminal após a

descongelamento. O ACP® pode assim ser utilizado como um diluidor alternativo para a criopreservação do sêmen nessa espécie, mas sugere-se a realização de maiores estudos acerca de seu protocolo de utilização.

Comparison between powder coconut water (ACP®) and Tris as extenders for canine semen cryopreservation

Abstract

The present study compared powder coconut water (ACP®) and Tris extenders on canine semen cryopreservation by classic evaluation and thermoresistance test. Five stud dogs were submitted to two semen collections by digital manipulation. Sperm fractions were analyzed regarding to its color, volume, sperm concentration, motility, vigor and morphology. Semen samples were divided into two aliquots: the first one was extended in Tris and second one in ACP®. Both extenders contained 20% egg yolk. Samples were cooled to 5°C, glycerol added (6%), packaged in 0.25mL straws, frozen in nitrogen vapors and finally stored in liquid nitrogen. One week later, thaw was performed at 38°C per 1min in water bath and new evaluations of sperm motility, vigor and morphology were conducted. Samples were kept at 38°C in water bath and evaluated at 15 and 30min after thaw. No significant difference was observed between extenders throughout cryopreservation or thawing procedures, as well as during thermoresistance test, concerning to characteristics evaluated. Tris and ACP® were efficient in conserving 50% mobile spermatozoa and 70% morphologically normal sperm after thaw. Thus, ACP® can be used as an alternative extender for canine semen cryopreservation.

Key-words:
Cryopreservation.
Sêmen.
Dog.
Tris.
Coconut water.

Referências

- 1 ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 243-255, 1993.
- 2 SILVA, A. R. et al. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 244-246, 2002.
- 3 CARDOSO, R. C. S. et al. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v. 59, p. 743-751, 2003a.
- 4 SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Congelamento do sêmen de cães com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. **Ciência Rural**, v.30, p.1021-1025, 2000.
- 5 CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Use of the alternative extender powder coconut water (PCW 106®) for canine semen freezing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 5th, 2004 São Paulo. **Anais...** São Paulo: Universidade Estadual de São Paulo, 2004. p. 96-97.
- 6 SALGUEIRO, C. C. M. et al. 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**, v. 5, p. 96-98, 2002.
- 7 SAMPAIO NETO, J. C. et al Utilização do diluente ACP 105® na refrigeração do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p. 137-139, 2002.
- 8 JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 592 p.
- 9 SILVA, A. R. et al. Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-829, 2003.
- 10 OETTLÉ, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 257-260, 1993.
- 11 PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa, **Theriogenology**, v. 54, p. 703-718, 2000.
- 12 ROTA, A. et al. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro

- incubation at 38°C. **Theriogenology**, v. 47, p. 1093-1101, 1997.
- 13 HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- 14 TSUTSUI, T. et al. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 51, p. 560-565, 1989.
- 15 STRÖM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, v. 48, p. 247-256, 1997.
- 16 THUN, R.; HURTADO, M.; JANNET, F. Comparison of Biociphos-Plus® and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p.1087-1094, 2002.
- 17 RASUL, Z. et al. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 59, p. 31-41, 2000.
- 18 EIMAN, M.; ABOAGLA, E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160-1172, 2004.
- 19 ZAMBELLI, D. et al. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37: p. 310-313, 2002.
- 20 NALLELLA, K. P. et al. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 913-918, 2004.
- 21 LAGUNA, L. E. **Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades (Cocos nucifera) coco da praia e anão**. 1996. Monografia (Especialização) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- 22 NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1., 1995, Fortaleza,. **Anais**. Fortaleza: Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da UECE, 1995. p. 53-63.
- 23 MADEIRA, V. H. L.; SILVA, A. R.; CARDOSO, J. F. S.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Uso da ACP® como diluidor para a conservação do sêmen de cães a 4°C. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ; 2004 Fortaleza,. **Anais...** Fortaleza: Pró Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa da UECE, 2004. p.1.
- 24 UCHOA, D. C. **Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluidores à base de água de coco**. 2004. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.