

Influência do meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-102c) na manutenção da atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados

Influence of Coconut Powder Water-Based Conservation Medium (APC-102c) for Maintaining Mitochondrial Activity of Cryopreserved Ram Sperm

Bruna Farias Brito¹, Bárbara Mara Bandeira Santos², Leonardo Alves Rodrigues Cabral¹, David Baruc Cruvinel Lima¹, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro³ & José Ferreira Nunes¹

ABSTRACT

Background: Semen extenders are required to protect and preserve semen, and the development of suitable extenders is key for artificial insemination. Although the use of Tris-based diluent is widespread, new diluents such as powdered coconut water have been developed for better sperm protection. One way to evaluate the effectiveness of diluents is through microscopic analyses that evaluate sperm motility, vigor, and concentration. However, these analyses are limited, and may not provide accurate results. New evaluation techniques have been studied, and one of the tests that can be used to add reliability to these analyses is mitochondrial activity evaluation, which can sum all the parameters, and provide a more accurate evaluation. Thus, the present study aimed to evaluate the efficacy of ACP-102c in cryopreserved ram semen.

Materials, Methods & Results: Five semen samples were collected from two ram breeders using artificial vagina (n = 10). Each ejaculate was divided into the following two treatments: T1 - ACP-102c + 20% egg yolk + 7% glycerol and T2 - TRIS + 20% egg yolk + 7% glycerol. Extended semen samples were then packed in 0.5 mL plastic straws, subjected through the refrigeration curve up to 4°C (0.35°C/min), and equilibrated for 2 h at 4°C. Subsequently, the straws were placed at 4 cm above liquid nitrogen level (-60°C) for 15 min, immersed, and then finally stored in the liquid nitrogen at -196°C. Both fresh and thawed samples were evaluated for total and progressive sperm motility using conventional microscopy (40x), and the same evaluator on each occasion. For plasma membrane integrity (IMP), the smear staining technique with the Eosin-Nigrosin staining was used; 200 sperms were counted and classified as whole (unstained) and unhealthy (stained). Mitochondrial activity was evaluated using a cytochemical technique based on the oxidation of 3,3'-diaminobenzidine (DAB); 200 sperms were counted, and classified into four classes (I, II, III, and IV) according to the degree of coloration of the intermediate part. Fresh semen showed no significant difference ($P > 0.05$) between treatments with respect to motility parameters; however, T2 showed significantly inferior results regarding plasma membrane integrity. After thawing, T2 was significantly higher in sperm motility parameters compared to T1. The mitochondrial activity and plasma membrane integrity parameters did not show any significant difference between the treatments.

Discussion: The TRIS-based diluent showed higher motility values than ACP-102c; however, motility rates in ACP-102c diluent, although lower, are considered satisfactory for insemination, which requires semen with minimal progressive motility of 30%. Notably, the cryopreservation protocol used in this study is the standard for TRIS-based diluent, and it is known that the optimal rate of refrigeration and cryopreservation may differ according to the composition of the storage medium; therefore, we may assume that the protocol used is not yet appropriate for the ACP-102c diluent, and further studies are required. IMP is an essential attribute for fertilization, and cryopreservation can affect the plasma membrane as observed in this study. Cryopreserved semen reduced the percentage of class I mitochondrial reaction sperms in both treatments, demonstrating that cryopreservation affects the mitochondrial activity of the intermediate portion of the sperm; however, there was no difference between treatments in thawed semen. Thus, we concluded that the ACP-102c conservation medium maintains seminal quality after thawing, and it can be used in artificial insemination processes.

Keywords: sperm, freezing, extender, 3,3'-diaminobenzidine, mitochondrial activity.

DOI: 10.22456/1679-9216.98684

Received: 12 August 2019

Accepted: 25 November 2019

Published: 14 December 2019

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV); ²Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) & ³Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (MPBIOTEC), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. CORRESPONDENCE: J.F. Nunes [ferreira.nunes@uece.br]. PPGCV - Faculdade de Veterinária - UECE. Av. Dr. Silas Munguba n. 1700. CEP 60.714.903 Fortaleza, CE, Brazil.

INTRODUÇÃO

A sobrevivência dos espermatozoides no plasma seminal é limitada, assim, para manter a qualidade seminal por um período prolongado e submetê-lo ao processo de criopreservação, faz-se necessária a diluição em soluções protetoras. Diferentes meios têm sido empregados como diluentes seminais e em sua maioria são variações de diluentes pré-estabelecidos [11].

No Brasil, a utilização de diluentes alternativos parece ser a solução para a adoção da inseminação artificial pelos pequenos produtores, já que as doses de sêmen, principalmente importada, têm um custo bastante elevado. Nesse contexto, destacamos o uso do diluente à base de água de coco, contendo proteínas, sais, açúcares, fatores de crescimento e fosfolipídios [21].

Uma forma de avaliar a eficácia dos diluentes é através de análise microscópica, onde parâmetros como motilidades, vigor e concentração espermática são analisados, no entanto, estas análises são limitadas, e muitas vezes não demonstram acurácia completa da amostra [17].

Portanto, novas técnicas de avaliação seminal vêm sendo estudadas, com o intuito de somar todos os parâmetros e obter uma avaliação de caráter qualitativo mais fidedigno e confiável. O desenvolvimento de técnicas que buscam a avaliação do *status* funcional das organelas espermáticas ou a integridade de componentes celulares permite uma maior acurácia e novas perspectivas para o problema [6]. Um dos testes utilizados para avaliar a atividade das mitocôndrias é a técnica citoquímica [12], baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do meio de conservação ACP-102c na criopreservação de espermatozoides ovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi executado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), inserido no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da UECE. O Núcleo está localizado na cidade de Fortaleza, no Estado do Ceará, Brasil, com latitude de 3°43'47" sul e longitude de 38°30'37" oeste e altitude de 16 metros acima do nível do mar. O clima da região, de acordo com a classificação de Koppen, é quente e úmido, com médias térmicas variando entre 26 a 27°C, máximas de 30°C e mínimas de 19°C.

Animais e coleta seminal

Utilizaram-se dois reprodutores ovinos adultos de idade média de 4 anos, mantidos em baias individuais, alimentados com feno de tifton (*Cynodon* sp.) e concentrado comercial com 18% de proteína bruta, além de sal mineral e água à vontade. As colheitas de sêmen foram realizadas com uso de vagina artificial, uma vez por semana, perfazendo cinco colheitas por animal, totalizando 10 ejaculados. Após a colheita, avaliou-se cada ejaculado quanto ao volume, concentração, motilidade massal, percentual de espermatozoides móveis e vigor. Foram utilizados apenas ejaculados com volume superior a 0,5 mL, concentração mínima de espermatozoides de $3,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL, escore mínimo de 3,5 para motilidade massal e vigor, percentual de espermatozoides móveis superior a 80%.

Criopreservação seminal

Para a criopreservação utilizaram-se os diluentes ACP-102c e TRIS. O diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c)¹ foi preparado segundo recomendação do fabricante. O diluente TRIS, baseado no proposto por Evans & Maxwell [7], consistiu na adição de 300 mM de Tris-(hidroximetil)-aminometano [Tris (Hidroximetil) Amino Metano P.A. - ACS]², 94,7 mM de ácido cítrico monohidratado (Ácido Cítrico P.A. - ACS)² e 27,8 mM de frutose (D- Frutose Puríssima)². Ambos diluentes foram acrescidos de 20% de gema de ovo, 7% de glicerol e 40 mg/100 mL de gentamicina (Gentamax[®])³ para cada 100 mL de diluente.

Os ejaculados foram divididos em duas alíquotas e diluídos a 34°C nos tratamentos ACP-102c (T1) e TRIS (T2) obtendo uma concentração final de 400×10^6 espermatozoides/mL. Em seguida, as amostras foram envasadas palhetas de inseminação artificial de 0,5 mL (Palhetas francesas IMV)⁴ e refrigeradas até 4°C em 90 min, a um decréscimo de 0,35°C/min. Ao atingir 4°C, as amostras foram acondicionadas em geladeira a 4°C por 2 h, para estabilização. Após este período, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio (-60°C) por 15 min, a uma altura de 4 cm do nitrogênio líquido, e então imersas em nitrogênio líquido a -196°C para armazenamento em botijões criogênicos.

Avaliação seminal

Para avaliação do sêmen criopreservado, duas palhetas por diluente/animal foram descongeladas banho Maria (Bivolt BM02)⁵ a 37°C por 30 s, acondicio-

nadas em tubos de plástico (ependorfs)⁶ e incubadas por 5 min em banho Maria a 37°C.

As amostras foram avaliadas quanto à motilidade espermática total e progressiva, à viabilidade espermática e à atividade mitocondrial espermática no sêmen fresco (diluído) e pós-descongelamento.

Para análise da motilidade espermática total e progressiva as amostras foram rediluídas utilizando o mesmo diluente de cada tratamento, de forma a se obter uma concentração espermática final em média de 40×10^6 espermatozoide/mL, assegurando a confiabilidade dos resultados. Alíquotas de 10 μ L de cada amostra foram analisadas individualmente em lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C e avaliadas em microscopia convencional (40x) (Nikon Eclipse 50i)⁷, sempre pelo mesmo avaliador.

A integridade de membrana plasmática (IMP) foi avaliada pela técnica de coloração de esfregaço utilizando o corante eosina-nigrosina (1 g de eosina amarela P.A.², 2 g nigrosina P.A.², 3,57 g de citrato de sódio P.A.² e água destilada q.s.p. 100 mL) [1]. Foram confeccionados esfregaços em lâmina pré-aquecida a 37°C utilizando 5 μ L do corante eosina-nigrosina adicionado de 5 μ L do sêmen rediluído. Foram contadas 200 células espermáticas e classificadas como íntegras (não coradas) e não íntegras (coradas) e considerado o percentual de células íntegras.

A atividade mitocondrial foi avaliada pela técnica citoquímica [12]. Foi pesado 0,0045 g do reagente (3,3'-diaminobenzidina - DAB)⁸ e diluído em 300 μ L de solução tampão fosfato salina (PBS)⁸. A seguir, uma alíquota de 25 μ L de amostra foi incubada com 50 μ L de DAB+PBS, a 37°C, por 40 min. Após incubação, foram confeccionados esfregaços em lâmina de vidro pré-aquecidas, estas fixadas em formol a 10% por 10 min, lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente (22°C). Todo o procedimento deste teste foi realizado protegido da luz.

Para análise da atividade mitocondrial, as lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase em aumento de 400x, sendo contados 200 espermatozoides/lâmina, e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em quatro classes: classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada, indicando alta atividade mitocondrial (DAB I); classe II: células espermáticas com mais da metade dos segmentos corados (ativos), indicando média atividade mitocondrial (DAB II);

classe III: células espermáticas com menos da metade dos segmentos corados (ativos), indicando baixa atividade mitocondrial (DAB III); classe IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada, indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV) [12].

Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos em média e desvio padrão e analisados através do programa estatístico Graphpad Prism (versão 5.01)⁹. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e posteriormente sofreram transformação angular em Arcoseno das porcentagens. As proporções encontradas para os parâmetros espermáticos e atividade mitocondrial foram submetidas ao teste T para comparação entre os diluentes em cada tempo de criopreservação, assim como para cada diluente nos diferentes tempos de criopreservação. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

No presente estudo, o sêmen ovino foi diluído e criopreservado em meios à base de ACP-102c (T1) e TRIS (T2). O sêmen fresco não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos quanto aos parâmetros de motilidades ($P > 0,05$); no entanto, as amostras diluídas no T2 apresentaram resultados estatisticamente inferiores no tocante à viabilidade espermática ($P < 0,05$) [Tabela 1]. Quando comparado o sêmen fresco diluído com o pós-descongelado, o sêmen fresco diluído apresentou resultados estatisticamente superiores ($P < 0,05$) em todos os parâmetros avaliados independente do diluente utilizado no sêmen ovino (Tabela 1).

Nas amostras de sêmen pós-descongelamento, o T2 foi estatisticamente superior nos parâmetros espermáticos de motilidade quando comparado ao T1 ($P < 0,05$). Em relação a viabilidade espermática não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos após a descongelamento ($P > 0,05$) [Tabela 1].

Em relação à atividade mitocondrial no sêmen ovino (Tabela 2), não houve diferença estatística significativa entre os diluentes na avaliação do sêmen fresco, bem como no descongelado ($P > 0,05$). No entanto, ao comparar cada diluente nos diferentes tempos (fresco e descongelado), o T1 apresentou diferença estatística significativa nas classes I, II e III, e o T2 nas classes I e IV ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Para criopreservação seminal é necessário a diluição do sêmen em soluções protetoras afim de manter a qualidade seminal por um período prolongado. Em relação à motilidade total e progressiva no sêmen descongelado do presente estudo, o diluente à base de TRIS apresentou valores superiores em relação ao diluente ACP-102c, corroborando com estudos anteriores, que ao avaliar sêmen ovino criopreservado observou que o TRIS também apresentou resultados superiores [4]. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre o TRIS e a ACP-106c, quanto a motilidade espermática quando avaliado sêmen canino descongelado [23]. Já em estudo posterior, também foi observado os mesmos resultados, do presente trabalho, sugerindo a ACP-106c como um diluente alternativo para o sêmen de cães [17].

Vários estudos mostram uma estreita relação entre motilidade seminal e o poder fecundante do sêmen [13,27], o que reforça a importância desse parâmetro para averiguar se um animal pode ser um reprodutor fértil. As taxas de motilidade no diluente ACP-102c, apesar de inferiores, são consideradas satisfatórias para inseminação, que exige sêmen com motilidade progressiva mínima de 30% [5]. De fato, ao

inseminarem ovelhas utilizando ACP-102c e água de coco *in natura* em sêmen refrigerado, obtiveram taxas de parição satisfatórias [16], e em outro obtiveram boas taxas de parição com sêmen refrigerado por 24 h em meio contendo água de coco em pó e *in natura* [8].

A viabilidade espermática avaliada pelo teste utilizando eosina-nigrosina (EN) foi afetada pela criopreservação em ambos os tratamentos; no entanto, não houve diferença estatística significativa entre TRIS e ACP-102c pós-descongelação, o que corrobora com resultados observados na literatura, quando comparado sêmen ovino criopreservado nos diluentes TRIS e ACP-102c [3]. A integridade da membrana espermática é um atributo essencial para a fertilização, e a criopreservação é capaz de afetar a membrana plasmática, bem como a região flagelar [14], como foi constatado nesse estudo.

Em relação à atividade mitocondrial (Tabela 2), o sêmen criopreservado reduziu a porcentagem de espermatozoides com reação mitocondrial classe I nos dois tratamentos. No tratamento ACP-102c observou-se um aumento das classes II e III; no entanto, o número de espermatozoides classe IV se manteve. Já no tratamento TRIS foi observado um aumento do número de espermatozoides com ausência de atividade mitocondrial (classe IV). Desta forma,

Tabela 1. Parâmetros de motilidade total (MT) e progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP) do sêmen ovino fresco e descongelado nos diluentes ACP-102c (T1) e TRIS (T2).

Parâmetro	Fresco		Descongelado	
	ACP-102c	TRIS	ACP-102c	TRIS
MT (%)	86,50 ± 7,47 ^{aA}	86,50 ± 7,47 ^{aA}	49,00 ± 11,97 ^{aB}	59,00 ± 9,94 ^{bB}
MP (%)	80,00 ± 8,20 ^{aA}	80,00 ± 8,20 ^{aA}	36,50 ± 9,40 ^{aB}	45,00 ± 10,80 ^{bB}
IMP (%)	91,55 ± 5,22 ^{aA}	77,80 ± 7,08 ^{bA}	60,50 ± 14,67 ^{aB}	58,05 ± 14,71 ^{aB}

Valores expressos em médias ± desvios padrões. ^{a,b}Diferença estatística entre os diluentes em cada tempo de avaliação ($P < 0,05$). ^{A,B}Diferença estatística entre os tempos de avaliação para cada diluente ($P < 0,05$).

Tabela 2. Avaliação da atividade mitocondrial (DAB) do sêmen ovino fresco e descongelado nos diluentes ACP-102c (T1) e TRIS (T2).

Classes DAB	Fresco		Descongelado	
	ACP-102c	TRIS	ACP-102c	TRIS
I	79,09 ± 10,52 ^{aA}	74,44 ± 8,54 ^{aA}	64,80 ± 12,74 ^{aB}	61,05 ± 12,14 ^{aB}
II	11,19 ± 7,71 ^{aA}	15,88 ± 3,33 ^{aA}	16,98 ± 7,62 ^{aB}	21,60 ± 6,87 ^{aA}
III	7,18 ± 4,04 ^{aA}	7,79 ± 4,99 ^{aA}	13,85 ± 7,19 ^{aB}	11,30 ± 5,61 ^{aA}
IV	2,55 ± 2,49 ^{aA}	1,90 ± 2,37 ^{aA}	4,87 ± 4,01 ^{aA}	6,05 ± 5,14 ^{aB}

Valores expressos em médias ± desvios padrões. ^{a,b}Diferença estatística entre os diluentes em cada tempo de avaliação ($P < 0,05$). ^{A,B}Diferença estatística entre os tempos de avaliação para cada diluente ($P < 0,05$). I= alta atividade mitocondrial; II= média atividade mitocondrial; III= baixa atividade mitocondrial; IV= ausência de atividade mitocondrial.

demonstra-se que o processo de congelamento do sêmen afeta a atividade das mitocôndrias presentes na peça intermediária dos espermatozoides. No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos no sêmen descongelado, demonstrando que o ACP-102c é um eficiente crioprotetor para a atividade mitocondrial na pós-descongelamento. Em estudo com caprinos, também observaram diferença significativa na atividade mitocondrial entre o sêmen fresco e criopreservado [3]. No presente trabalho, mais da metade das células espermáticas permaneceram com alta atividade mitocondrial na análise pós-descongelamento, o que pode justificar os índices de motilidade satisfatórios nos dois diluentes.

Estudos relacionam as disfunções mitocondriais causadas pela criopreservação espermática ao estresse oxidativo e à diminuição da atividade mitocondrial [19]. Ao avaliar pacientes com infertilidade, foi observado que estes possuíam baixa atividade mitocondrial [28], em adição a isso, em outro estudo, ao realizarem experimento com fecundação *in vitro*, observaram que amostras com maior poder fecundante possuíam células espermáticas com alto potencial de membrana mitocondrial [15].

Uma estreita relação da atividade mitocondrial com a motilidade das células espermáticas já foi observada, sugerindo que algumas causas de azoospermia no homem poderia ter relação com defeitos na função mitocondrial [20]. Adicionalmente, também já foi observado que pacientes com desordens mitocondriais primárias tinham motilidade espermática reduzida [9].

Desta forma, o dano mitocondrial durante a criopreservação pode ser a maior razão para redução da qualidade do sêmen pós-descongelamento [23]. Variáveis como motilidade total e progressiva podem ser consideradas indicadores indiretos da função mitocondrial da célula espermática [2].

Neste estudo, foi observado que no parâmetro DAB, houve uma redução da atividade mitocondrial classe I de aproximadamente 14,29%, no diluente ACP-102c, e 13,39% no diluente TRIS da atividade mitocondrial antes e pós-congelamento, enquanto que na motilidade espermática essa redução foi de 37,5% (ACP-102c) e 27,5% (TRIS), demonstrando que as células mesmo apresentando atividade mitocondrial, podem estar imóveis, o que corrobora com a literatura, que verificaram ser possível haver espermatozoides vivos, mas sem motilidade [26].

Resultados como os obtidos nesse experimento demonstram que o ACP-102c tem a capacidade de manter a membrana espermática íntegra e uma alta atividade mitocondrial após a criopreservação; no entanto, não foi capaz de manter a motilidade espermática semelhante ao diluente TRIS, mas vale ressaltar que apesar do ACP-102c ter sido inferior em relação a motilidade, os dados obtidos estão acima do recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Além disso, o protocolo de criopreservação utilizado nesse estudo é o padrão para o diluente à base de TRIS, e sabe-se que a taxa ótima de refrigeração e criopreservação pode diferir de acordo com a composição do meio de conservação [21], podemos assim supor que o protocolo utilizado ainda não seja o mais apropriado para o ACP-102c, sendo necessário mais estudos.

CONCLUSÃO

O meio de conservação ACP-102c se mostrou eficiente na manutenção da qualidade dos espermatozoides ovinos criopreservados, já que mantém a integridade da membrana, a atividade mitocondrial e a motilidade espermática recomendados pelo CBRA. Como complemento, possui um menor custo econômico e com uma relação custo/benefício positiva para os programas de inseminação artificial e uma maior praticidade.

MANUFACTURERS

¹ACP Biotecnologia. Fortaleza, CE, Brazil

²Dinâmica Química Contemporânea Ltda. Indaiatuba, SP, Brazil.

³Marcolab Agroline Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Campo Grande, MS, Brazil.

⁴IMV Technologies France. L'Aigle, Normandie, France.

⁵Kacil Indústria e Comércio Ltda. Recife, PE, Brazil.

⁶Axygen Life Science Corning Inc. Tewksbury, MA, USA.

⁷Nikon Instruments Inc. Tokyo, Japan.

⁸Sigma-Aldrich Merck KGaA. Darmstadt, Germany.

⁹GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA.

Acknowledgements. Ao Laboratório de Tecnologia de Sêmen Caprinos e Ovinos e ao Laboratório de Reprodução de Carnívoros da Universidade Estadual do Ceará, ao Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, ao CNPq, à FUNCAP e à CAPES.

Ethical approval. Esta pesquisa foi realizada após avaliação e aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, com protocolo nº 1845940/2016.

Declaration of interest. Os autores declaram não haver conflitos de interesse. Somente os autores são responsáveis pelo conteúdo e redação do artigo.

REFERENCES

- 1 Baril G., Chemineau P., Cognie Y., Guérin Y., Leboeuf B., Orgeur P. & Vallet J.C. 1993. *Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins*. Nouzilly: FAO, 125p.
- 2 Budworth P.R., Amann R.P. & Chapman P.L. 1988. Relationships between computerized measurements of frozen and thawed bull spermatozoa and fertility. *Journal of Andrology*. 9: 41-54.
- 3 Cavalcante J.M.M., Brasil O., Salgueiro C.C.M., Salmito-Vanderley C.S.B. & Nunes J.F. 2014. Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c). *Ciência Animal Brasileira*. 15(3): 344-353.
- 4 Cavalcante T.V., Esper C.R., Ferreira J.L., Dias H.C., Azevedo M.F., Cordeiro M.F. & Souza J.A.T. 2005. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós-descongelamento de caprinos das raças Boer e Alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva. *Archives of Veterinary Science*. 10: 89-93.
- 5 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 2013. *Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 104p.
- 6 Correa J.R., Pace M.M. & Zavos P.M. 1997. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*. 48: 721-731.
- 7 Evans G. & Maxwell W.M.C. 1990. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Acribia, 192p.
- 8 Figueirêdo E.L., Nunes J.F., 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. 2007. 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*. 14: 95-97.
- 9 Folgero T., Bertheussen K., Lindal S., Torbergsen T. & Oian P. 1993. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Human Reproduction*. 8: 1863-1868.
- 10 Graham J.K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*. 68: 239-247.
- 11 Hafez B. & Hafez E.S.E. 2004. *Reprodução Animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 513p.
- 12 Hrudka F. 1987. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *International Journal of Andrology*. 19: 809-828.
- 13 Januskauskas A., Johannisson A. & Rodríguez-Martínez H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation to sperm viability, chromatin structure and field fertility. *Theriogenology*. 60: 743-758.
- 14 Jeyendran R.S., Vander-Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G. & Zanevld L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characters. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70: 219-228.
- 15 Kasai T., Ogawa K., Mizuno K., Nagai S., Uchida Y., Ohta S., Fujie M., Suzuki K., Hirata S. & Hoshi K. 2002. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian Journal of Andrology*. 4: 97-104.
- 16 Machado V.P., Nunes J.F., Araújo A.A., Fernandez D.R.P., Cordeiro M.A., Medeiros C.H.N., Medeiros A.L.N. & Monteiro A.W.U. 2006. 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*. 43: 43-49.
- 17 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. 2014. Cryopreservation of canine epididymal sperm using ACP-106c and TRIS. *Cryobiology*. 69(1): 17-21.
- 18 Nunes J.F. & Salgueiro C.C.M. 1999. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. *Revista Científica de Produção Animal*. 1(1): 17-26.
- 19 O'Connell M., McClure N. & Lewis S.E.M. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*. 17(3): 704-709.
- 20 Ruiz-Pesini E., Diez C., Lapen A.C., Perez-Martos A., Montoya J., Alvarez E., Arenas J. & Lopez-Perez M.J. 1998. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry*. 44(8): 1616-1620.
- 21 Salamon S. & Maxwell W.M.C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 37: 185-249.
- 22 Salamon S. & Maxwell W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 77-111.

- 23 Schober D., Aurich C., Nohl H. & Gille L. 2007.** Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 68: 745-754.
- 24 Silva A.R., Cardoso R.C.S. & Silva L.D.M. 2000.** Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. *Ciência Rural*. 6: 1021-1025.
- 25 Silva S.V. & Guerra M.M.P. 2011.** Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35(4): 370-384.
- 26 Soosalu O., Einarsson S. & Gustafsson B. 1975.** Studies on whole semen and epididymal contents in a bull with low post-thawing sperm motility. *Nordisk Veterinarian Medicine*. 27: 518-522.
- 27 Stålhammar E.M., Janson L. & Philpsson J. 1994.** The impact of sperm motility on non-return rate in preselected dairy bulls. *Reproduction Nutrition and Development*. 34: 37-45.
- 28 Troiano L., Granata A.R., Cossarizza A., Kalashnikova G., Bianchi R., Pini G., Tropea F., Carani C. & Franceschi C. 1998.** Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Experimental Cell Research*. 241: 384-393.