

ERICK FONSECA DE CASTILHO

USO DO EXTRATO LÍQUIDO DE MELANCIA (*Citrullus lanatus*) NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TOUROS DA RAÇA NELORE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C352u
2012

Castilho, Erick Fonseca de, 1981-

Uso do extrato líquido de melancia (*Citrullus lanatus*) na
criopreservação de sêmen de touros da raça Nelore / Erick
Fonseca de Castilho. – Viçosa, MG, 2012.

xv, 40f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 31-40

1. Bovino - Reprodução. 2. Sêmen. 3. Criopreservação de
órgãos, tecidos, etc. 4. Antioxidantes. 5. *Citrullus lanatus*.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20824

ERICK FONSECA DE CASTILHO

USO DO EXTRATO LÍQUIDO DE MELANCIA (*Citrullus lanatus*) NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TOUROS DA RAÇA NELORE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de maio de 2012.

Profa. Jeanne Broch Siqueira

Profa. Simone Eliza F. Guimarães

Prof. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres

Prof. José Domingos Guimarães
(Orientador)

Na vida, o importante não é ser, ter ou parecer.

O importante é fazer, construir e desenvolver.”

(Autor desconhecido)

Dedico esta obra a Deus!

*Aos quatro amores da minha vida: minha Princesa, **Mariana Lacerda Castilho**; minha vida **Ariane Lacerda de Castilho**; minha Santa Mãe, **Ruth de Castilho**; e ao meu Grande Pai, **Roberto de Figueiredo Castilho**.*

Ao meu Avô, Osvaldo (“in memorian”), e à minha Avó, Creuza (“in memorian”), pois me incentivam espiritualmente e emocionalmente, para que seja um profissional correto, tenha amor pelos animais e pela ciência.

AMO TODOS VOCÊS!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o Ser Supremo, pela vida e oportunidade de ser uma pessoa honesta em um mundo que pouco se conhece a dignidade, o amor, a paz e a justiça.

Aos meus pais, Ruth de Castilho e Roberto de Figueiredo Castilho, pessoas indispensáveis na minha vida, dando-me amor, educação, dignidade e honestidade, troféus que levarei comigo até a morte. **AMO VOCÊS!**

À minha esposa, Ariane Lacerda de Castilho, por ser minha amiga e companheira nos momentos alegres e tristes. Por me amar e por termos formado uma família linda. Por ser minha base nesses momentos decisivos desta jornada. Você realmente é MARAVILHOSA! **TE AMO MEU AMOR!!!**

À minha princesa, Mariana Lacerda Castilho, por ser minha profunda inspiração, minha vida. Obrigado pelos momentos de alegrias, travessuras e muito amor. Você foi o melhor presente de todos. A minha preciosidade. **TE AMO DEMAIS TETEI!!!**

Ao meu Avô, Osvaldo (*in memorian*), e à minha Avó, Creuza (*in memorian*), como exemplo de simplicidade, paz e vontade de viver.

Ao meu Padrinho, Lázaro Lima, e à minha Madrinha, Raimunda Lima, como lição de carinho, orientação moral e compreensão.

À minha família capixaba Waltair (Goim), Léa, Vanilton, Amanda e Aline, pelo apoio e carinho. Obrigado por me deixar fazer parte desta família linda.

Aos todos os meus sobrinhos e meus afilhados, Ana Luisa, Yuri, Richard e Pudim, assim como meus compadres e comadres, Wagner, Gelly, Simonne, Robert e Dú. Amo vocês!

Ao meu orientador e amigo, Prof. José Domingos Guimarães, pelos ensinamentos, amizade, compreensão, bondade e extrema humildade de viver. Por acreditar em meu potencial. **OBRIGADO, JEI!!!**

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos membros da banca examinadora (qualificação e defesa de tese), professores Eduardo Paulino da Costa, Simone Guimarães, Giovani Ribeiro Carvalho, Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, Ciro Alexandre Alves Torres e Jeanne Broch Siqueira, por participarem da equipe e pelas sugestões.

Aos companheiros do Grupo Gera, Leonardo, Jeanne, Rogério, Madriano, Morgana, Carol, Homer, Boca, Maurício, José Carlos, João, Hugo e Pedro. Obrigado pelos momentos de alegria e troca de conhecimentos. **Vocês são 1.000!!!**

À Rosi, pela amizade e imensurável apoio durante minha jornada na pós-graduação. **Você é *show*!**

À empresa Casa do Adubo, nas pessoas de Nicolau Covre e José Eduardo, pela amizade, conhecimentos adquiridos e pelo apoio para execução desta obra.

À Fazenda Porto do Engenho, nas pessoas do Dr. Daílson Laranja e Eli, e aos estagiários e amigos, Élder e Rogéria, pois sem vocês a execução do experimento a campo seria impossível. Obrigado!

Ao Prof. Patarroyo, por abrir as portas de seu laboratório para realizarmos os testes complementares deste estudo, indispensáveis para a continuidade desta obra.

Ao Gildázio Tonolli, pela amizade, apoio e pelo grande aprendizado na ovinocultura.

Muitíssimo obrigado!

BIOGRAFIA

ERICK FONSECA DE CASTILHO, filho de Roberto de Figueiredo Castilho e Ruth de Castilho, nasceu em Belém-Pará, em 25 de setembro de 1981.

Em 2000, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-Pará, graduando-se em maio de 2005.

Em março de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Mestrado), na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Reprodução Animal, tendo defendido a dissertação de Mestrado em fevereiro de 2008.

Em março de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Doutorado), na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Reprodução Animal, tendo defendido a Tese de Doutorado em fevereiro de 2012.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Membrana plasmática do espermatozoide	2
2.2. Considerações gerais sobre a criopreservação de sêmen	3
2.2.1. Eventos celulares que ocorrem durante a criopreservação	4
2.3. Crioprotetores	7
2.3.1. Crioprotetores não penetrantes	7
2.3.2. Crioprotetores penetrantes	8
2.4. Radicais livres e espécies reativas do metabolismo do oxigênio	9
2.4.1. Peroxidação lipídica	10
2.5. Melancia	11
2.5.1. Composição	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Sêmen <i>in natura</i>	19
4.2. Sêmen pós-descongelado	21
5. CONCLUSÕES	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
1 Composição nutricional de 100g de polpa das cultivares Pérola, <i>Crimson Sweet</i> e <i>Jubilee</i> de diferentes origens (média \pm desvio padrão).....	12
2 Composição química (100 g ou ml de polpa) de melancia.....	13
3 Composição química do diluente base (BOVIMIX® – NUTRICELL) e dos diluentes modificados contendo a melancia (<i>Citrullus lanatus</i>)..	16
4 Aspectos físicos do sêmen <i>in natura</i> em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.....	19
5 Percentual de espermatozoides não corados no teste supravital, espermatozoides reativos no teste hiposmótico e das características morfológicas dos espermatozoides <i>in natura</i> em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.....	19
6 Correlações Simples de Pearson entre os aspectos físicos do sêmen <i>in natura</i> , espermatozoides não corados no teste supravital, espermatozoides reativos no teste hiposmótico e características morfológicas dos espermatozoides em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.....	20
7 Motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) e no pós-descongelamento durante o teste de termorresistência (TTR), de acordo com o diluente, em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.....	22
8 Vigor espermático* do sêmen diluído (pré-resfriamento) e pós-descongelamento durante o teste de termorresistência (TTR) em cada diluente em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.....	25
9 Percentual de espermatozoides não corados no teste supravital*, percentual de espermatozoides reativos no teste hiposmótico e epifluorescência e características morfológicas dos espermatozoides observados no momento do descongelamento durante o teste de termorresistência, de acordo com o diluente, em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.....	26
10 Correlações Simples de Pearson entre as médias gerais na motilidade e vigor espermático do sêmen, nos testes supravital, hiposmótico e epifluorescência e características morfológicas dos espermatozoides observados no momento do descongelamento durante o teste de termorresistência, de acordo com o diluente, em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.....	29

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
1 Taxas de resfriamento e congelamento na criopreservação de sêmen bovino empregando a máquina Cryogen Dualflex – NEOVET®.....	17

RESUMO

CASTILHO, Erick Fonseca de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2012. **Uso do extrato líquido de melancia (*Citrullus lanatus*) na criopreservação de sêmen de touros da raça Nelore.** Orientador: José Domingos Guimarães. Orientadores: Eduardo Paulino da Costa e Jeferson Ferreira da Fonseca.

Os objetivos deste estudo foram avaliar o potencial do extrato líquido de melancia como meio diluidor natural no resfriamento e congelamento do sêmen, e determinar o efeito crioprotetor do extrato líquido de melancia sobre a integridade de membrana plasmática dos espermatozoides de bovinos. Foram utilizados quatro touros da raça Nelore. Para as coletas de sêmen, utilizou-se o método de eletroejaculação, onde se obteve 10 ejaculados por animal. Após a coleta, fez-se o exame físico do sêmen e morfológico dos espermatozoides, teste supravital e teste hiposmótico. Em seguida, o sêmen *in natura* foi dividido em quatro alíquotas iguais e diluído de acordo com os diluentes: D1 (Bovimix® - controle); D2 (base Bovimix® + 25 % de extrato líquido de melancia); D3 (base Bovimix® + 50 % de extrato líquido de melancia); e D4 (base 100 % de extrato líquido de melancia). Após as diluições finais, foram avaliados a motilidade e o vigor espermático de cada diluente, e posterior envase. As palhetas foram resfriadas e congeladas na máquina de congelamento (Cryogen Dualflex®). Após o congelamento, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido para o congelamento final do sêmen. As doses foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, e acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL e homogeneizadas para análise imediata de motilidade e vigor espermático, características morfológicas dos espermatozoides, teste supravital, teste hiposmótico, teste de epifluorescência e teste de termorresistência. No sêmen *in natura*, o volume, motilidade espermática progressiva, vigor espermático, concentração espermática por mL, teste supravital, teste hiposmótico, defeitos espermáticos maiores e totais variaram entre os animais, porém não houve diferença entre os mesmos ($P > 0,05$). O aspecto, turbilhonamento e defeitos espermáticos menores apresentaram diferença entre os animais ($P < 0,05$). A motilidade espermática apresentou correlação alta e positiva ($r = 0,98$) com o teste hiposmótico. O teste supravital apresentou correlação alta e positiva ($r = 0,88$) com o teste hiposmótico. Houve correlação média e negativa ($r = -0,48$) entre a motilidade espermática progressiva e a concentração espermática por mL, bem como houve correlação média e negativa ($r = -0,46$) do teste hiposmótico com a concentração espermática por mL. No sêmen diluído (pré-resfriamento), as médias da motilidade e vigor espermático em todos os diluentes utilizados, não apresentaram

diferença entre si ($P>0,05$). A motilidade espermática progressiva no momento do descongelamento e no final do TTR apresentou diferença entre os diluentes ($P<0,05$), onde os valores superiores foram obtidos pelos diluentes D1 e D2, e valores menores foram obtidos pelos diluentes D3 e D4. No início do TTR, não houve diferença do diluente D1 com o diluente D2. Porém, houve diferença do diluente D1 com os diluentes D3 e D4. Não houve diferença do diluente D2 com os diluentes D3 e D4. Enquanto que no final do TTR, não houve diferença do diluente D1 com os diluentes D2 e D4, porém, houve diferença do diluente D1 com o diluente D3. Não houve diferença do diluente D2 com os diluentes D3 e D4. As médias dos espermatozoides vivos no teste supravital no momento do descongelamento, em todos os diluentes utilizados, não apresentaram diferença entre si ($P>0,05$). Durante o TTR, as médias do vigor do sêmen pós-descongelado, em todos os diluentes utilizados, não apresentaram diferença entre si ($P>0,05$). O teste hiposmótico apresentou diferença entre os diluentes ($P<0,05$), onde valores mais altos foram registrados com o uso do diluente 1, valor intermediário foi registrado com o diluente D2 e valores inferiores foram registrados com os diluentes D3 e D4. Os valores do teste hiposmótico não diferiram entre os diluentes D1 e D2, assim como os valores do teste hiposmótico do diluente D2 não diferiu dos diluentes D3 e D4. Porém, os valores do teste hiposmótico do diluente D1 foram diferentes dos diluentes D3 e D4. Não houve diferença do diluente D2 com os diluentes D3 e D4. O teste de epifluorescência apresentou diferença entre os diluentes ($P<0,05$), porém não houve diferença do diluente D1 com o diluente D2. Não houve diferença entre os diluentes D2 e D3, bem como, não houve diferença entre os diluentes D3 e D4. Porém, houve diferença do diluente D1 com os diluentes D3 e D4. Houve diferença do diluente D2 com os diluentes D4. Os defeitos espermáticos maiores e totais variaram entre os diluentes, porém não houve diferença entre os mesmos ($P>0,05$). No entanto, os defeitos espermáticos menores apresentaram diferença entre os diluentes ($P<0,05$), onde o diluente D3 apresentou o maior número de espermatozoides com defeitos menores e os demais diluentes se apresentaram com valores inferiores. Não houve diferença do diluente D1 com os demais diluentes. Porém, houve diferença do diluente D3 com o diluente D4. No diluente 1, os valores obtidos no teste supravital apresentaram correlação média e positiva ($r = 0,49$) com a motilidade espermática. O teste hiposmótico apresentou correlação alta e positiva ($r = 0,89$) com os espermatozoides íntegros e correlação alta e negativa ($r = -0,80$) com os espermatozoides lesados observados no teste de epifluorescência. No diluente 2, os valores obtidos no teste hiposmótico apresentaram correlação alta e positiva ($r = 0,86$)

com os espermatozoides íntegros, correlação alta e negativa ($r = -0,83$) com os espermatozoides lesados e correlação média e positiva ($r = 0,41$) com os espermatozoides semi-lesados observados no teste de epifluorescência. No diluente 3, os valores obtidos no teste supravital apresentaram correlação baixa e positiva ($r = 0,33$) com a motilidade espermática. O teste hiposmótico apresentou correlação alta e positiva ($r = 0,82$) com os espermatozoides íntegros, correlação alta e negativa ($r = -0,80$) com os espermatozoides lesados e correlação média e positiva ($r = 0,51$) com os espermatozoides semi-lesados observados no teste de epifluorescência. No diluente 4, os valores obtidos no teste supravital apresentaram correlação média e positiva ($r = 0,46$) com a motilidade espermática. O teste hiposmótico apresentou correlação alta e positiva ($r = 0,83$) com os espermatozoides íntegros e correlação alta e negativa ($r = -0,85$) com os espermatozoides lesados e correlação baixa e positiva ($r = 0,38$) com os espermatozoides semi-lesados observados no teste de epifluorescência. Nas concentrações de 50 % e 100%, o extrato líquido de melancia não se mostrou eficaz na manutenção da integridade e viabilidade espermática pós-descongelamento. Na concentração de 25 %, o extrato líquido de melancia manteve a integridade estrutural da membrana dos espermatozoides durante o processo de criopreservação, bem como sua viabilidade após o teste de termorresistência, podendo ser uma alternativa na composição de diluentes para criopreservação de sêmen bovino.

ABSTRACT

CASTILHO, Erick Fonseca de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2012. **Use of liquid watermelon extract (*Citrullus lanatus*) in cryopreservation of semen of Nelore bulls.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-Advisers: Eduardo Paulino da Costa and Jeferson Ferreira da Fonseca.

The objectives of this study were to evaluate the potential of liquid watermelon extract as a natural diluent for cooling and/or freezing semen, and determining the cryoprotectant effect of liquid watermelon extract on the integrity of the plasma membrane of bovine sperm. Semen from four adult bulls were used, totalizing 10 semen samples for each one. After semen collection, the evaluation consisted of physical and morphological exam, live and dead cells (supravital test) and hypoosmotic swelling test. Afterwards, the fresh semen was divided in four equal parts and diluted with respective extenders: D1 (Bovimix® - control); D2 (Bovimix® base + 25 % of liquid watermelon extract); D3 (Bovimix® base + 50 % of liquid watermelon extract); and D4 (100 % of liquid watermelon extract base). After final dilutions, sperm motility and vigor were evaluated in each extender, and posterior seal. The straws were cooled and frozen in the freezing machine (Cryogen Dualflex®). Then, the straws were immersed in nitrogen. The thawing of the samples was done by immersion of the straws in a 37 °C water-bath for 30 minutes to evaluate the sperm motility and vigor, morphological characteristics of sperm, supravital test, hypoosmotic swelling test, epifluorescence test and thermoresistance test. The volume, motility, sperm vigor, sperm concentration per mL, supravital test, hypoosmotic swelling test, major and total sperm defects varied among animals, but showed no difference between them ($P>0.05$). The appearance, whirlpool and minor sperm defects showed differences among animals ($P<0.05$). Sperm motility showed high and positive correlation ($r = 0.98$) with the hypoosmotic swelling test. The supravital test showed high and positive correlation ($r = 0.88$) with the hypoosmotic swelling test. There was an average and negative correlation ($r = -0.48$) between motility and sperm concentration per mL, as well as average and negative correlation ($r = -0.46$) between the hypoosmotic swelling test and sperm concentration per mL. The motility and sperm vigor of the diluted semen (pre-cooling) in all extenders used, presented no difference between them ($P>0.05$). The motility upon thawing and at the end of thermoresistance test differed between extenders ($P<0.05$), where higher values were obtained by diluents D1 and D2, and lower values were obtained by diluents D3 and D4. At the beginning of the thermoresistance test, there was no difference between

diluents D1 and D2. However, there was a difference when comparing the diluent D1 with D3 and D4. There was no difference between the diluent D2 and D3 or D2 and D4. At the end of the thermoresistance test, there was no difference between the diluents D1 and D2 or D1 and D4, but there was a difference between D1 and D3. There was no difference when comparing the diluent D2 with D3 and D4. The average sperm alive in the supravital test at the time of thawing in all extenders used, presented no difference between them ($P>0.05$). During the thermoresistance test, the average vigor of post-thawed semen, in all extenders used, showed no difference between them ($P>0.05$). The hypoosmotic swelling test differed between extenders ($P<0.05$), where higher values were recorded in the diluent D1, an intermediate value was recorded in the diluent D2 and lower values were recorded in the diluents D3 and D4. There was no difference when comparing the diluent D1 with D2 and, no difference in between the diluents D2 and D3 or D2 and D4. However, there was a difference when comparing the diluent D1 with D3 and D4. There was no difference between the diluents D2 and D3 or D4. The epifluorescence test differed between extenders ($P<0.05$), but there was no difference between diluents D1 and D2. There was no difference between the diluents D2 and D3, or between the diluents D3 and D4. However, there was a difference when comparing D1 with D3 and D4. There were differences between diluents D2 and D4. The major and total sperm defects ranged among extenders, but showed no difference between them ($P>0.05$). However, minor sperm defects differed between extenders ($P<0.05$), where the highest values were observed in the diluent D3, and lower values were observed in the other diluents. There was no difference between diluent D1 and the other extenders. However, there was a difference between diluents D3 and D4. In the diluent D1, the values obtained in the supravital test showed average and positive correlation ($r = 0.49$) with sperm motility. The hypoosmotic swelling test showed high and positive correlation ($r = 0.89$) with intact sperm and, high and negative correlation ($r = -0.80$) with damaged spermatozoa observed in epifluorescence test. In the diluent D2, the values obtained in hypoosmotic test showed high and positive correlation ($r = 0.86$) with intact sperm, high and negative correlation ($r = -0.83$) with damaged spermatozoa and, average and positive correlation ($r = 0.41$) with semi-damaged sperm observed in epifluorescence test. In the diluent 3, the values obtained in the supravital test showed low and positive correlation ($r = 0.33$) with sperm motility. The hypoosmotic test showed high and positive correlation ($r = 0.82$) with sperm integrity, high and negative correlation ($r = -0.80$) with damaged sperm and, average and positive correlation ($r = 0.51$) with semi-damaged sperm observed in epifluorescence test. In the

diluent D4, the values obtained in the supravital test showed average and positive correlation ($r = 0.46$) with sperm motility. The hypoosmotic swelling test showed high and positive correlation ($r = 0.83$) with intact sperm, high and negative correlation ($r = -0.85$) with damaged sperm and, low and positive correlation ($r = 0.38$) with semi-damaged sperm observed in epifluorescence test. At concentrations of 50 % and 100 %, the liquid watermelon extract was not effective in maintaining the integrity and sperm viability after thawing. At the concentration of 25 %, the liquid watermelon extract maintained the structural integrity of the membrane of spermatozoa during the cryopreservation process, and viable after the thermoresistance test, could be an alternative in the composition of diluents for cryopreservation of bovine semen.

1. INTRODUÇÃO

Vários estudos têm sido desenvolvidos, pesquisando a viabilidade do sêmen diluído, criopreservado ou não, para determinação do melhor diluidor e conseqüentemente, melhores índices de fertilidade. Um dos pré-requisitos para o sucesso da Inseminação Artificial é o uso de um diluente capaz de manter a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (MORENO et al., 2001).

Os processos atuais de criopreservação envolvem diferentes etapas que no seu transcorrer levam a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Dentre estes, destacam-se o radical livre superóxido e, o não radical, peróxido de hidrogênio. O ROS atua de diferentes maneiras na membrana plasmática celular, promovendo a peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados. Além disso, o ROS aumenta a fragmentação do DNA, despolimerizando ácidos hialurônicos, modifica o citoesqueleto e inibe a fusão dos espermatozoides com o ovócito promovendo a diminuição da fertilidade (MAXWELL e WATSON, 1996; OCHSENDORF, 1999).

Para diminuir os efeitos do ROS, existem nos espermatozoides e no plasma seminal antioxidantes potentes (catalase, superóxido dismutase, vitamina E, ácido ascórbico, etc.) para prevenir a formação de radicais livres. Todavia, este sistema não é potente o suficiente para prevenir a peroxidação de lipídios completamente, especialmente durante a estocagem *in vitro* (resfriamento e/ou congelamento), onde a produção de radicais livres é significativamente aumentada como resultado de mudanças metabólicas (OCHSENDORF, 1999; BANSAL e BILASPURI, 2011).

A melancia contém o carotenoide licopeno e este tem sido fonte de estudos pela sua ação antioxidante, tendo participação importante no mecanismo que protege o organismo dos efeitos prejudiciais dos radicais livres. A melancia apresenta um considerável teor de licopeno, superando o tomate, considerado uma das mais importantes fontes deste carotenoide. O uso de licopeno *in vitro* reduz a taxa de danos oxidativos no DNA e melhora a motilidade espermática de humanos (JONES et al., 1991; MORI, 1996; ALVARENGA e RESENDE, 2002; EMBRAPA, 2010). Adicionalmente, outros componentes (açúcares, minerais, vitaminas, etc.) da melancia podem atuar sinergicamente na manutenção estrutural e funcional da membrana plasmática dos espermatozoides criopreservados. Não há relatos científicos do uso do extrato líquido de melancia sobre a criopreservação de sêmen animal.

Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial do extrato líquido de melancia como meio diluidor natural no resfriamento e congelamento no sêmen, e determinar o efeito crioprotetor do extrato líquido de melancia sobre a integridade de membrana plasmática dos espermatozoides dos bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Membrana plasmática do espermatozoide

O espermatozoide pode ser dividido em duas partes funcionais e morfológicamente distintas: a cabeça e a cauda. A membrana plasmática da cabeça é subdividida em três segmentos, os quais cobrem o acrossoma, a região equatorial e a região pós-acrossômica. Da mesma maneira, a membrana da cauda possui um segmento que cobre a peça intermediária e outro, a peça principal. Toda a estrutura básica da membrana do espermatozoide se forma durante a espermatogênese, período em que essas células possuem no citoplasma organelas essenciais à síntese, como retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Durante o desenvolvimento da fase inicial de espermátide, formam-se duas estruturas especializadas da membrana, que são o anel nuclear ou anel posterior, que se forma na região do colo da célula e será o limite entre a cabeça e a peça intermediária, e o “annulus”, na extremidade anterior do canal do flagelo e será o limite entre a peça intermediária e a peça principal (HOLT, 1984; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos sofre mudanças na morfologia e composição química durante a passagem e maturação espermática no epidídimo. Os espermatozoides coletados nos epidídimos de bovinos, suínos e ovinos são mais resistentes ao choque térmico que espermatozoides ejaculados destas mesmas espécies (AMANN e PICKETT, 1987). Segundo Holt (1984), o espermatozoide adquire ácido siálico em sua superfície durante sua passagem pelo epidídimo, o que o torna carregado negativamente, atraindo e absorvendo proteínas em regiões bem definidas da membrana. Há evidências de que durante o trânsito epididimário e a maturação espermática, há aumento da fluidez da membrana em decorrência da elevação do teor de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados e diminuição da concentração de colesterol (HOLT, 1984).

A composição bioquímica da membrana espermática varia muito entre as espécies. A relação entre colesterol e fosfolipídios na espécie ovina é de 0,85 (HOLT e NORTH, 1985); 0,83 na espécie humana (MACK et al., 1986); 0,36 na equina (AMANN e GRAHAM, 1993); 0,20 na suína (PARKS e GRAHAM, 1992) e oscila entre 0,51 e 0,53 na bovina (PARKS et al., 1981). De acordo com estes autores, espera-se que quanto maior a relação entre colesterol e fosfolipídios, maior será a estabilização de membrana e proteção do espermatozoide durante a criopreservação.

Os carboidratos da superfície celular espermática são carregados negativamente, exercendo atração sobre proteínas e glicoproteínas do meio externo. Estes carboidratos formam verdadeiro glicocálice na superfície espermática, exercendo função primordial na

interação entre esta célula e o ovócito (AMANN e PICKETT, 1987), sendo constituídos basicamente por ácido siálico (HOLT, 1984).

Ashizawa et al. (1987) observaram variações nos teores de sódio, potássio, cloro, cálcio, fósforo, magnésio, cobre, zinco, ferro e manganês na superfície de espermatozoides de touro, cão, galo e rato, bem como em regiões distintas da célula (cabeça, peça intermediária e cauda), porém o padrão de distribuição espacial foi similar entre as espécies estudadas.

2.2. Considerações gerais sobre a criopreservação de sêmen

A tecnologia para armazenar o sêmen congelado foi revolucionada aproximadamente há 60 anos com a descoberta do glicerol como crioprotetor, o que permitiu que o espermatozoide fosse congelado e armazenado por longos períodos (POLGE et al., 1949). Esta biotecnologia tem sido de grande importância em programas de melhoramento animal por viabilizar a preservação de material genético de animais em extinção, além de auxiliar a transpor barreiras da infertilidade masculina. No entanto, com exceção da espécie bovina, têm-se obtido baixas taxas de fertilidade com o emprego de sêmen congelado (HOLT, 2000a; WATSON, 2000), visto que, a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide após o descongelamento encontram-se reduzidas como consequência das injúrias durante o processo de congelamento. Outro fator importante que causa esta baixa fertilidade em outras espécies é duração do estro, pois dificulta a decisão do melhor momento para a inseminação (MEDEIROS et al., 2002).

Os eventos ocorridos durante a criopreservação envolvem os seguintes passos: redução da temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al., 2002). Estes procedimentos ocasionam danos celulares devido a mudanças na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozoide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (WATSON, 1996). A célula espermática é sensível ao estresse osmótico como também à adição e à remoção de crioprotetores (WATSON, 2000).

A espécie bovina requer um tempo de equilíbrio antes do congelamento a fim de que se alcance melhores resultados no pós-descongelamento. Experimentos realizados por Fiser et al. (1996) demonstraram efeito positivo da incubação sobre os parâmetros avaliados. Altas taxas de sobrevivência e baixa porcentagem de danos ao acrossoma foram evidenciadas quando o sêmen ficou exposto a temperatura de 5 °C por períodos superiores a duas horas. O tempo de equilíbrio se faz necessário por possibilitar a troca de lipídios entre a membrana e o diluente. Tal troca levaria a maior resistência do espermatozoide durante o congelamento e o descongelamento.

2.2.1. Eventos celulares que ocorrem durante a criopreservação

A criopreservação representa uma interrupção artificial do processo de capacitação do espermatozoide pós-ejaculação e na fertilização. O maior problema com relação à criopreservação de sêmen é que mesmo utilizando as melhores técnicas, o padrão de sobrevivência pós-descongelamento é restrito em cerca de 50 % da população espermática (WATSON, 1996).

As mudanças celulares que ocorrem durante o congelamento não estão associadas à sua habilidade de se armazenarem em temperaturas muito baixas, mas sim, à sua letalidade numa zona de temperatura intermediária (-15 a -60 °C), onde a célula atravessa esta zona em dois momentos (congelamento e descongelamento). Nenhuma reação térmica ocorre num meio aquoso à temperatura de nitrogênio líquido (-196 °C), sendo que uma explicação para isso é que não existe água líquida em torno de -130 °C. O único estado físico que existe são os cristais e nesse estado a viscosidade é alta e a difusão insignificante, portanto à -196 °C não há energia térmica para reação química (AMANN e PICKET, 1987; WATSON, 1996; WATSON, 2000).

Durante o processo de criopreservação, o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37 a 20 °C), o que parece não ocasionar danos aos espermatozoides quando este se encontra diluído em meio adequado (WILHELM et al., 1996). O estresse inicial se dá quando o espermatozoide passa da temperatura corporal para 5 °C (SQUIRES et al., 1999). Isto é devido à fase de transição da membrana plasmática, passando do estado líquido cristalino para o estado de gel devido ao rearranjo dos fosfolipídios de cadeias polinsaturadas (MEDEIROS et al., 2002). Esses fosfolipídios estão localizados ao redor das proteínas integrais, que evitam a ocorrência da fase hexagonal II. Porém, durante o resfriamento, essas proteínas se movem para regiões mais fluidas, permitindo que ocorra a formação de uma micela invertida, na qual as porções apolares hidrofóbicas se voltam para o exterior. Portanto, esse processo fragiliza a barreira de permeabilidade, promovendo alterações físicas e estruturais das membranas plasmática e acrossomais (HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1996).

Para minimizar este efeito é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19 a 8 °C pela adição de lipídios (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente (CUNHA, 2002), além de utilizar curvas de resfriamento lentas (-0,05 °C/min). Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, o espermatozoide sofre um fenômeno conhecido como choque térmico, o qual induz a danos irreversíveis aos espermatozoides que se caracterizam por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou

retrogrado), perda rápida de motilidade, danos do metabolismo, da membrana plasmática e do acrossoma (SQUIRES et al., 1999; OHATA et al., 2005).

O termo “Estresse Térmico” ou “Choque Térmico” define um conjunto de alterações ocorridas nos espermatozoides dos mamíferos quando resfriados rapidamente da temperatura corpórea até temperaturas próximas a 5 °C, que tem como consequência um decréscimo irreversível da motilidade espermática, mudanças na bioquímica e no funcionamento das células espermáticas incluindo diminuição da taxa da glicólise, da respiração celular e da frutólise, aumento na degeneração do ácido desoxirribonucleico e liberação de material intracelular (CUNHA, 2002).

Quando a temperatura do meio atinge entre -5 e -10 °C, cristais de gelo se formam, a partir da água pura no meio extracelular, porém protegido pela membrana plasmática, o meio intracelular não se congela (super-refrigerado). O ponto de congelamento de uma solução é determinado pela concentração de seus solutos. Em decorrência disto, a água do interior da célula flui por osmose para o meio externo e também se congela. Os outros elementos do meio extracelular (sais, proteínas e gorduras), permanecem na porção não congelada. Com a temperatura diminuindo, mais moléculas de água se cristalizam, resultando em uma concentração maior de solutos na fração não congelada, que formarão os “canais não congelados”. O volume destes canais é importante, pois somente as células que estiverem neles irão sobreviver à criopreservação (AMANN e PICKETT, 1987; HOLT, 2000a).

Durante o processo de congelamento, a suspensão de espermatozoides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super-resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, ocorre um aumento na temperatura que é necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozoide, sendo minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento (SQUIRES et al., 1999; GONÇALVES et al., 2002).

Entre -5 a -10 °C começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular (super-resfriado), criando um gradiente osmótico entre a solução intracelular inicialmente isotônica e a solução congelada extracelular que se encontra concentrada, favorecendo a troca de água para manter o equilíbrio e ocasionando a desidratação celular. Neste ponto, a taxa de congelamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Na maioria dos casos, células submetidas à formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas ou lisadas devido à perda da integridade da membrana (HAFEZ e HAFEZ, 2004; RATH et al., 2004). Uma desidratação severa promove desnaturação das

macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (MEDEIROS et al., 2002).

Durante a criopreservação, a perda de água pelo espermatozoide é um evento desejável, pois reduz a probabilidade de se formarem grandes canais de gelo dentro da célula que causariam danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática (SQUIRES et al., 1999).

No decorrer do congelamento, ocorrem violentas mudanças osmóticas que promovem injúrias muitas vezes irreversíveis nas células. Tais injúrias se minimizam quando diluentes hipertônicos são utilizados para a criopreservação. Tal fato foi observado em bovinos por Correa et al. (1997) e em ovinos por Fiser e Fairfull (1986).

Os efeitos deletérios dos crioprotetores estão relacionados a diversos fatores, dentre os quais, o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, indução da fusão da mesma, além da inibição da atividade enzimática. Sua toxicidade pode resultar em desnaturação de proteínas e as alterações das interações da actina (FAHY, 1996).

Devido à permeabilidade da maioria dos agentes crioprotetores serem inferior a da água, ocorre um influxo de água o qual resulta no aumento do volume celular. A exposição das células a uma solução hiperosmótica é responsável pela remoção da água intracelular, conseqüentemente ocorre o encolhimento celular e o influxo de íons, no entanto, o descongelamento proporciona o efeito inverso, havendo, portanto o influxo de água, o que pode acarretar na ruptura da membrana (HOLT, 2000b).

Quando se congela uma célula espermática lentamente, existe tempo hábil para que uma grande quantidade de água migre da célula para o meio extracelular, na tentativa de reverter os danos do efeito de solução. Neste caso, é imprescindível que o descongelamento se faça também lentamente, para que os volumes de água sejam reequilibrados antes da total descongelamento, evitando que grandes alterações do volume celular provoquem lesão da membrana espermática. Por outro lado, se o congelamento se dá rapidamente não ocorre uma grande alteração no volume de água no interior da célula e microcristais de gelo serão ali formados. O descongelamento neste caso deve ser realizado também de maneira rápida, pois, se esta é realizada de maneira lenta a água intracelular se descongela em um momento em que existe ainda temperatura baixa o suficiente para haver uma recristalização da água recém-descongelada. Se isto acontecer, grandes cristais, advindos da recristalização se formarão, expondo a célula ao risco de sofrer perfurações por estes grandes cristais de gelo (AMANN e PICKETT, 1987; WATSON, 1996; HOLT, 2000b).

2.3. Crioprotetores

2.3.1. Crioprotetores não penetrantes

O mecanismo de ação dos agentes crioprotetores não penetrantes baseia-se na proteção dos espermatozoides contra os efeitos osmóticos durante o processo de congelamento, promovendo um meio hipertônico que induz a saída de água das células levando a desidratação. Desta forma, eles agem no meio extracelular, reduzindo assim a possibilidade da formação de cristais de gelo intracelular, como é o caso das lipoproteínas gema de ovo, proteínas do leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina (AMANN e PICKETT, 1987).

A gema de ovo é rotineiramente utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen de mamíferos com o intuito de proteger contra o choque térmico. Acredita-se que sua ação seja devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando a membrana do espermatozoide. As lipoproteínas atuam na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolípidios e aparentemente induzindo a uma alteração transitória de sua composição, prevenindo a ruptura da membrana plasmática (HINSCH et al., 1997). Os fosfolípidios que compõem a fração LDL da gema de ovo protegem o sêmen especificamente durante o processo de resfriamento a 5 °C. O uso de fosfatidilserina purificada tem demonstrado proteger as células espermáticas de bode e touros contra o choque térmico. Lipossomas que compõem o colesterol e a fosfatidilserina protegem o espermatozoide de bovinos e garanhões dos danos do processo de congelamento, possivelmente por prevenir as alterações deletérias durante a criopreservação (WILHELM et al., 1996).

A prevenção conferida pelos lipídios com relação ao choque térmico parece estar relacionada à quelação do íon Ca^{+2} do meio, evitando sua entrada no espermatozoide. É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelamento que afetem a tonicidade ou a fração da água não congelada durante a criopreservação (JANUSKAUSKAS et al., 2000).

Os açúcares atuam por meio da pressão osmótica na desidratação celular, reduzindo a água passível de ser congelada no interior da célula de modo a reduzir a injúria causada pela cristalização de gelo. Além de atuarem como crioprotetores, os açúcares são substratos energéticos para o espermatozoide durante a incubação (CUNHA, 2002). Também fornecem proteção por meio de interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolípidios. Por restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolípidios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema. Geralmente os dissacarídeos, sacarose e trealose, são os mais efetivos em estabilizar a

bicamada do que os monossacarídeos (DE LEEUW, 1993; HOLT, 2000a), mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e manutenção de lipídios numa fase fluida na ausência de água (JANUSKAUSKAS et al., 2000).

2.3.2. Crioprotetores penetrantes

São substâncias que atuam tanto no meio intra como extracelular. Sendo os mais comumente utilizados: glicerol, etilenoglicol, DMSO e amidas. O mecanismo de ação destes crioprotetores baseia-se em estruturas que promovem ligações de hidrogênio com as moléculas da água. Estas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células. A ação coligativa destas substâncias com a água deprime o ponto de congelamento de uma solução. Em uma solução que contenha glicerol, disporá de mais água não congelada do que outra sem o glicerol, aumentando o volume dos canais de solventes não congelados, reduzindo a concentração de sais das porções não congeladas. Portanto, atuam tanto como solvente como soluto (AMANN e PICKETT, 1987; SOARES et al., 2002).

A descoberta da ação do glicerol foi de grande importância na criopreservação de sêmen, pois até então este evento não era possível, sendo atualmente o agente mais utilizado nas espécies mamíferas domésticas (POLGE et al., 1949; HOLT, 2000a).

O glicerol induz a mudanças nos eventos citoplasmáticos por aumentar a viscosidade ao penetrar a célula espermática, causa alterações na polimerização da tubulina, na associação dos microtúbulos, no balanço bioenergético além de atuar diretamente de modo prejudicial na membrana plasmática, no glicocálice e nas proteínas de superfície celular (GONZALEZ, 2004).

Apesar de seu mecanismo de ação não se encontrar perfeitamente esclarecido, sabe-se que este penetra na membrana celular através da difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma. Embora a concentração de crioprotetor seja elevada no meio, sua difusão é 30 a 60 vezes menor do que a da água (CUNHA, 2002). Assim sendo, estas moléculas atravessam a membrana até atingir um equilíbrio, porém a água o faz mais rapidamente, ocasionando o enrugamento da célula devido à pronta saída de água para diluir a alta concentração externa e somente depois de um período é que o crioprotetor penetra e equilibra as concentrações intra e extracelulares. Nessas condições a água retorna para o interior da célula até atingir um equilíbrio que resulta na retomada do seu tamanho normal (GONZALEZ, 2004).

Além do seu efeito osmótico, parece atuar diretamente na membrana plasmática, havendo evidências de que o glicerol se liga aos grupos de cabeça dos fosfolipídios reduzindo

a fluidez da membrana, interagindo com ligações proteicas e glicoproteicas da membrana (CORREA e ZAVOS, 1994).

O crioprotetor reduz o estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interações com íons e macromoléculas, assim como redução do ponto de congelamento da água (MEDEIROS et al., 2002).

A concentração de glicerol ideal para a sobrevivência do espermatozoide é espécie dependente, variando de acordo com a curva de congelamento, componentes do diluente e método de envase. Em bovinos, a concentração varia entre 7 a 9 %, nos caprinos 3 a 4 % e em ovinos de 4 a 6 % de glicerol (AMANN e PICKETT, 1987; WILHELM et al., 1996).

2.4. Radicais livres e espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS)

Radical livre é qualquer átomo ou molécula, que contém um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, um número ímpar de elétrons, em sua última camada eletrônica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG e ÁRNER, 2001). O elemento oxigênio, por definição, pode ser considerado um radical livre, uma vez que possui dois elétrons desemparelhados, cada um localizado em um orbital, na última camada (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Segundo Ferreira e Matsubara (1997) este desemparelhamento de elétrons da última camada, confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas.

Espécies reativas ao oxigênio (ROS) é um termo coletivo usado no meio científico, que inclui todos os radicais e não radicais derivados do metabolismo do oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG e ÁRNER, 2001). Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), o termo oxidante também pode ser utilizado para designar as ROS. Entretanto, para esses autores o termo não é o mais adequado, visto que, algumas ROS (superóxido e peróxido de hidrogênio) podem atuar tanto como agentes oxidantes como redutores, em sistemas diferentes.

O espermatozoide, como qualquer outra célula em condições aeróbicas, produz ROS, sendo a maior parte delas originadas do metabolismo normal da célula. Dentre as ROS formadas, destacam-se o peróxido de hidrogênio e os radicais superóxido, hidroxila e hidroperoxila (AITKEN, 1995; DE LAMIRANDE et al., 1997).

As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. Durante esse processo, são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido, hidroperoxila e hidroxila e, o não radical, peróxido de hidrogênio. Normalmente, a redução completa do oxigênio ocorre na

mitocôndria e a reatividade das ROS é neutralizada pela entrada dos quatro elétrons (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ÁRNER, 2001).

Distúrbios no balanço oxidante:antioxidante, em favor do oxidante levam a danos celulares, os quais são denominados danos oxidativos ou estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode resultar em adaptação ou injúrias celulares. Em princípio, o estresse oxidativo pode ser causado pela diminuição de antioxidantes no sistema ou pelo aumento exagerado na produção de ROS (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; OCHSENDORF, 1999).

2.4.1. Peroxidação lipídica

O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de ROS, que ao ter contato com os ácidos graxos poli-insaturados da membrana espermática, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez irá agir em outro ácido graxo poli-insaturado. Este processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando alterações estruturais na membrana plasmática, com perda de fluidez e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático, mudanças no metabolismo celular e perda da capacidade de fertilização do espermatozoide (AITKEN e KRAUSZ, 2001; MARQUES et al., 2002).

Nos sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agentes óxidos-redutores, como as ROS e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados por via endógena como consequência direta do metabolismo do oxigênio. Para se proteger do efeito letal da formação excessiva de ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante, que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como protetora do agente antes que ele cause lesão (glutathione redutase, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e vitamina E) e a outra como reparadora da lesão ocorrida (ácido ascórbico, glutathione redutase e glutathione peroxidase). Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; IMAI e NAKAGAWA, 2003).

Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), a primeira indicação de que o estresse oxidativo pode afetar a viabilidade e função do espermatozoide, ocorreu em 1943, quando MacLeod observou que o espermatozoide humano rapidamente perdia sua motilidade quando incubado a elevadas concentrações de oxigênio e que a adição de catalase oferecia alguma proteção.

Estudos posteriores têm confirmado que os espermatozoides e os leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar ROS. A susceptibilidade do espermatozoide aos danos oxidativos causados pelos ROS, decorrem da alta quantidade de ácidos graxos poli-

insaturados presentes na sua membrana plasmática. Estes ácidos graxos são altamente predispostos ao ataque dos radicais livres e conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios. A acumulação de peróxidos de lipídios na superfície do espermatozoide causa disfunção e morte celular (KRZYZOSIAK et al., 2000; BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002). Os leucócitos geram ROS durante a fagocitose e são capazes de gerar 100 vezes mais ROS que as células espermáticas. Por isso, os leucócitos representam uma poderosa e perigosa fonte de ROS, podendo causar efeitos prejudiciais na função espermática (BAUMBER et al., 2002).

Os antioxidantes presentes no plasma seminal ajudam a protegê-lo dos danos oxidativos. Porém, a centrifugação do sêmen e retirada do plasma seminal sobrenadante pode remover esta capacidade protetora, principalmente, se houver presença de alguns íons de metais de transição (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). No plasma seminal existem enzimas e algumas moléculas com ação antioxidante, tais como a glutathione peroxidase, superóxido desmutase, catalase, vitamina E, vitamina C, uratos, albumina, taurina, hipotaurina, entre outras (BALL et al., 2000).

Esses agentes controlam a produção de ROS, prevenindo possíveis danos celulares. Porém, na presença de um grande número de células inflamatórias e espermatozoides defeituosos ou em procedimentos que diminuam acentuadamente a quantidade de plasma seminal, há um aumento na produção de ROS (BAUMBER et al., 2000; AITKEN, 2004).

A produção excessiva de ROS e a capacidade antioxidante do sêmen determinam o estresse oxidativo, que causa disfunções na própria célula espermática por meio de diferentes mecanismos, como a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática, inibição do metabolismo, da motilidade e da capacidade fecundante (GUERRA et al., 2004).

Apesar desses efeitos prejudiciais, a produção de ROS faz parte do funcionamento normal da célula espermática, visto que, baixas concentrações de ROS estão envolvidas com a hiperativação dos espermatozoides, sendo sua produção um pré-requisito para capacitação espermática, além de ser relacionada à ligação com a zona pelúcida e fusão do espermatozoide com o oócito (AURICH et al., 1997; BROUWERS e GADELLA, 2003).

2.5. Melancia

A melancia (*Citrullus lanatus*) pertence à família Cucurbitaceae, é cultivada em todo o mundo, sendo considerada cosmopolita. Tem uma expressiva importância no agronegócio brasileiro, sendo cultivada sob irrigação e em condições de sequeiro. Diferentemente do cultivo irrigado, que pode ocorrer durante o ano todo e se utiliza cultivares comerciais, a produção em regime de sequeiro, onde se utiliza os tipos locais apenas uma vez por ano, durante o período chuvoso, apresentam grande variabilidade quanto às características de

aparência externa, cor da polpa, teor de açúcar, conservação pós-colheita, entre outras (JONES et al., 1991).

Os cultivos comerciais de melancia no Brasil são com cultivares de origem americana ou japonesa, que se adaptaram bem às nossas condições edafoclimáticas. No entanto, deve-se considerar que entre estas, a mais plantada é a cv. *Crimson Sweet* e tipos semelhantes, que é de origem americana, respondendo praticamente por mais de 90 % do fornecimento ao mercado consumidor. Mas, considerando o mercado internacional, há diversos cultivares, que diferem entre si quanto à forma e ao tamanho do fruto, à coloração externa e da polpa, sem considerar a variabilidade genética das raças crioulas na agricultura tradicional. (JONES et al., 1991; MORI, 1996; ALVARENGA e RESENDE, 2002).

2.5.1. Composição

A composição físico-química da melancia varia em função dos cultivares. Nas Tabelas 1 e 2 são apresentadas a composição nutricional e química dos cultivares Pérola, *Crimson Sweet* e *Jubilee*.

TABELA 1. Composição nutricional de 100g de polpa das cultivares Pérola, *Crimson Sweet* e *Jubilee* de diferentes origens (média \pm desvio padrão).

Componentes	<i>Crimson Sweet</i> São Paulo	Pérola Goiás	<i>Jubilee</i> São Paulo
Umidade (%)	90,79 \pm 0,02	90,55 \pm 0,43	92,71 \pm 0,03
Frutose (%)	2,86 \pm 0,12	2,94 \pm 0,11	-
Glicose (%)	1,80 \pm 0,03	1,586 \pm 0,07	-
Sacarose (%)	2,07 \pm 0,04	2,72 \pm 0,13	-
Açúcares totais (%)	6,73	7,22	6,25 \pm 0,08
Açúcares redutores (%)	4,66	4,50	3,71 \pm 0,01
Cinzas (%)	0,30 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02	0,14 \pm 0,003
Proteínas (%)*	0,71 \pm 0,0	0,43 \pm 0,02	-
Lipídios (%)	0,036 \pm 0,004	0,007 \pm 0,02	-
Fibra (%)	0,14 \pm 0,003	0,12 \pm 0,0	-
Pectina (%)**	0,0095 \pm 0,0005	0,07 \pm 0,004	0,001 \pm 0,003
Acidez total***	14,6 \pm 0,08	9,38 \pm 1,56	Não detectada
Sólidos solúveis	9,4 \pm 0,03	-	8
pH	5,35 \pm 0,02	-	-
Licopeno (mg)	4,12 \pm 0,09	-	5,89
Calorias	30,08	30,66	-

*% N x 6,25; **Calculado como pectato de cálcio; ***mL NaOH 0,1mol/L/100g.

Obs.: Total de calorias determinado pela equação: % lipídios x 9 + % proteína x 4 + % de açúcares totais x 4.

Fonte: Mori (1996).

A melancia é uma das frutas mais ricas em vitaminas vendidas no Brasil, com altos teores de pró-vitamina A e de vitaminas C, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B6, B12, niacina, ácido fólico e biotina. A pigmentação vermelha da polpa é dada pelo licopeno, um carotenoide com atividade antioxidante. Nas cultivares de polpa amarela, a cor é em função

dos carotenoides, do β -caroteno (pró-vitamina A) e das xantofilas (JONES et al., 1991; MORI, 1996; ALVARENGA e RESENDE, 2002; EMBRAPA, 2010).

Estudos realizados com o objetivo de quantificar os principais carotenoides da melancia *Crimson Sweet*, produzida nos estados de São Paulo e Goiás, em amostras coletadas na Central de Abastecimento (CEASA) de Campinas, demonstraram que a melancia contém quase exclusivamente licopeno, com uma pequena quantidade de β -caroteno. Os teores de licopeno e de β -caroteno foram, respectivamente, de 36 ± 5 e $4,7 \pm 2,4$ mg/g para as frutas produzidas em São Paulo, e de $35 \pm 2,0$ e $2,6 \pm 1,7$ mg/g para as produzidas em Goiás. As concentrações destes dois carotenoides são semelhantes às encontradas em tomate da cultivar Carmen (35 ± 10 mg/g para licopeno e $3,2 \pm 0,6$ mg/g para β -caroteno), evidenciando a melancia como uma importante fonte de licopeno (MORI, 1996).

TABELA 2. Composição química (100 g ou mL de polpa) de melancia.

Componentes	Mori (1996)*	FAO (2011)
Água (%)	91,14	91,51
Carboidratos (g)	-	7,18
Proteína (g)	0,64	0,50
Lipídios (g)	0,04	0,43
Cálcio (mg)	6,46	8,00
Fósforo (mg)	7,77	9,00
Potássio (mg)	90,03	116,00
Magnésio (mg)	10,81	11,00
Manganês (mg)	0,062	-
Zinco (mg)	0,083	-
Cobre	0,065	-
Ferro (mg)	0,28	0,17
Sódio (mg)	1,40	-
Vitamina A (UI)	-	315,0
Tiamina (mg) (B ₁)	-	0,04
Riboflavina (mg) (B ₂)	-	0,05
Niacina (mg) (B ₅)	-	0,20
Ácido ascórbico (mg) (C)	-	9,60
Valor energético (cal)	30,00	22,00

*Cultivar *Crimson Sweet*

Fonte: Gebhardt e Matheus (1988) citado por Mori (1996) e FAO (2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no período de setembro de 2011 a fevereiro de 2012, na Fazenda Porto do Engenho, localizada no município de Cariacica-ES, situada a 20° 15' 56" latitude Sul e 40° 25' 13" a Oeste de Greenwich, altitude média de 46 m, temperatura média anual entre 22 e 24 °C, índice pluviométrico anual de 1.250 mm e clima do tipo tropical de altitude (CWB - clima temperado úmido com inverno seco e verão temperado) pela classificação de Köppen.

Foram utilizados quatro touros da raça Nelore, hípidos e com boa condição de escore corporal, criados em condições semi-intensivas, em pastejo rotacionado com predominância de *Brachiaria decumbens* e com suplementação de ração e silagem de milho ao cocho. A idade dos animais na ocasião do início do experimento foi de três anos e, avaliados e aprovados para reprodução por meio de exame andrológico, de acordo com os padrões de qualidade de sêmen *in natura* preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Os ejaculados foram obtidos pelo método de eletroejaculação, com sessões de coletas em intervalo de três dias para cada reprodutor, até alcançar um total de 10 ejaculados viáveis por animal. Foram considerados ejaculados viáveis para este estudo aqueles que apresentaram padrões físicos mínimos de volume total de 5 mL, motilidade espermática total de 70 % e vigor espermático de três, e padrões morfológicos máximos de 30 % de defeitos totais e 10 % de defeitos maiores (CBRA, 1998), sendo descartados aqueles que não apresentaram padrões físicos mínimos. Os ejaculados coletados foram armazenados em tubos plásticos de 15 mL (Falcon®) protegidos de luz solar com papel laminado. Posteriormente, os tubos foram encaminhados ao laboratório para a realização das análises físicas do sêmen. As amostras de sêmen foram mantidas em temperatura ambiente (25 °C) até o momento da diluição.

Na avaliação física do sêmen *in natura*, foram analisados os seguintes aspectos: volume (mL), aspecto (1 = aquoso; 2 = opalescente; 3 = leitoso; 4 = cremoso), turbilhonamento (0-5), motilidade espermática progressiva retilínea (%), vigor (0-5) e concentração espermática (espermatozoides/mL). Uma gota de sêmen de cada ejaculado foi colocada em uma lâmina previamente aquecida a 37 °C e avaliou-se o turbilhonamento (movimento espermático em massa) em aumento de 100 X em microscopia óptica de luz. Posteriormente, colocou-se uma lamínula previamente aquecida a 37 °C sobre a gota de sêmen e, em aumento de 400 X, foram avaliados a motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático, tal como preconizado pelo CBRA (1998).

Em tubo plástico de 1,5 mL (Eppendorf®) contendo 1 mL de solução fixadora de formol salina tamponada (HANCOCK, 1957) foram acondicionadas alíquotas do sêmen

suficiente para turvar a solução, para análise morfológica dos espermatozoides por meio de preparação úmida e com auxílio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1250 X. Foram contabilizadas 400 células por ejaculado e a porcentagem dos defeitos espermáticos (maiores, menores e totais) foi registrada segundo os critérios estabelecidos por Blom (1973) e preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Uma alíquota de sêmen *in natura* foi submetida ao teste supravital para avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça dos espermatozoides empregando-se eosina-nigrosina na proporção 1:1 (sêmen:corante), classificando-os em vivos (não-corados) e mortos (corados de rosa – avermelhados), após 60 segundos de confecção da lâmina (MAYER et al., 1951; SWANSON e BEARDEN, 1951; SMITH e MURRY, 1997).

As amostras do sêmen *in natura* foram submetidas ao teste hiposmótico para determinação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides. Foram considerados normais os espermatozoides que responderam ao teste (reativos) enrolando ou dobrando a cauda após a adição da solução hiposmótica. Utilizou-se a solução hiposmótica de 100 mOsm/kg (9 g de frutose, 4,9 g de citrato trissódico e água destilada suficiente para completar 1.000 mL) (REVELL e MRODE, 1994). Uma alíquota de 10 µL da amostra de sêmen foi adicionada em 1 mL de solução hiposmótica e, após a homogeneização, foi incubada em banho-maria a 37 °C. Após 15 minutos de incubação (MARTINS et al., 2011), 0,5 mL de solução formol-salina tamponada foi adicionada nas amostras para fixação dos espermatozoides e estocadas em temperatura ambiente até o dia das análises. Estas amostras foram homogeneizadas e uma alíquota de 10 µL foi colocada entre lâmina e lamínula e analisadas em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1250 X, analisando-se 100 espermatozoides amostra de sêmen *in natura*.

Após o exame físico, o sêmen *in natura* foi dividido em quatro frações iguais em tubos graduados. Cada fração de sêmen foi diluída na proporção 1:1 (1ª diluição) de acordo com o diluente: diluente 1 (D1 – controle) – diluente comercial Bovimix® - NUTRICELL; diluente 2 (D2) – base Bovimix® + 25 % de extrato líquido de melancia; diluente 3 (D3) – base Bovimix® + 50 % de extrato líquido de melancia; diluente 4 (D4) – base 100 % de extrato líquido de melancia (TABELA 3). Antes das diluições, todos os diluentes estavam em temperatura ambiente para evitar choque térmico nos espermatozoides.

A composição básica dos diluentes 2, 3 e 4 foi processada na empresa Nutricell Nutrientes Celulares Ltda., em virtude de a mesma apresentar rigoroso controle de qualidade para fabricação de soluções biológicas e celulares.

Neste estudo, o extrato líquido de melancia foi obtido a partir do fruto maduro (*Crimson Sweet*), em que a região externa do fruto foi lavada com sabão líquido neutro e

desinfetada com solução clorada (1 parte de hipoclorito de sódio para 9 de água mineral). Posteriormente, retirou-se a casca e a porção branca da polpa, expondo a polpa vermelha do fruto para a retirada de pequenos cubos da polpa para o processamento e obtenção do extrato líquido. Excluíram-se as sementes, trituraram-se os cubos e realizaram-se três filtrações seguidas com papel vegetal, para obtenção do extrato líquido da melancia. Após este processamento, adicionou-se o extrato líquido de melancia nos diluentes previamente fabricados, de acordo com as concentrações supracitadas.

TABELA 3. Composição química do diluente base (BOVIMIX® – NUTRICELL) e dos diluentes modificados contendo a melancia (*Citrullus lanatus*).

Componentes	BOVIMIX® (diluente 1)	BOVIMIX® base + 25 % melancia (diluente 2)	BOVIMIX® base + 50 % melancia (diluente 3)	Base 100 % melancia (diluente 4)
Tampão salino				
TRIS/EDTA q.s.p. (mL)	100	25	50	---
Extrato líquido de melancia q.s.p. (mL)	---	75	50	100
Glicerol (%)	7	7	7	7
Gema de ovo (%)	20	20	20	20
Penicilina (UI)	50.000	50.000	50.000	50.000
Estreptomicina (UI)	50.000	50.000	50.000	50.000
Espectinomicina (mg)	30	30	30	30
Lincomicina (mg)	15	15	15	15
Orvus es Paste (%)	0,32	0,32	0,32	0,32

Após a 1ª diluição, adicionou-se uma alíquota de 10 µL de sêmen diluído de cada fração em 2 mL de solução formol salina tamponada (proporção de 1:200) para determinação da concentração espermática/mL (método hematocitométrico – Câmara de Neubauer), cálculo do número de doses e do volume final de diluente a ser adicionado (diluição final).

Após as diluições finais, as amostras foram avaliadas quanto à motilidade e vigor espermático. Posteriormente, foram envasadas em palhetas finas de 0,25 mL (modelo francês e previamente identificado quanto a partida e grupo de tratamentos) com concentração total de 50 milhões de espermatozoides/dose ou 200 milhões/mL em temperatura ambiente. Após o envase, as palhetas foram colocadas na máquina de congelamento de sêmen (Cryogen Dualflex – Neovet®) e a criopreservação foi realizada com o Protocolo Bovino 3, de acordo com as recomendações do fabricante para sêmen de bovinos (FIGURA 1).

Após o congelamento, as palhetas foram armazenadas em *racks* devidamente identificadas e estocadas em botijão com nitrogênio líquido (-196 °C) para análises posteriores.

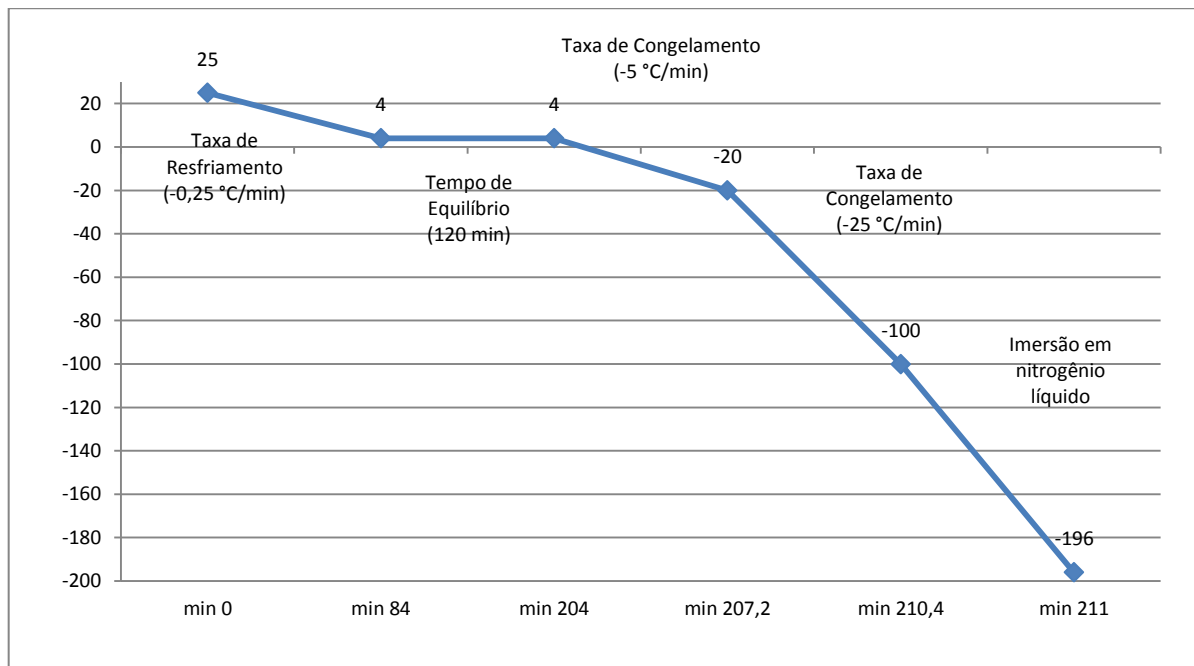


FIGURA 1. Taxas de resfriamento e congelamento na criopreservação de sêmen bovino empregando a máquina Cryogen Dualflex – NEOVET®.

As doses congeladas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL (Eppendorf®) e homogeneizadas para análise imediata da motilidade progressiva e vigor espermático, por meio de microscopia com contraste de fase, em aumento de 200 X (CBRA, 1998). Uma amostra de sêmen de cada partida, após o descongelamento, foi submetida ao teste de termorresistência (TTR) para avaliação de sua motilidade após o estresse térmico. A motilidade progressiva retilínea e o vigor espermático foram avaliados nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos (total de 3 horas) de incubação em banho-maria a 37 °C (VOGLER et al., 1991). Da mesma forma, duas alíquotas de sêmen representando cada partida de sêmen descongelada foram submetidas ao teste supravital e hiposmótico, respectivamente, para avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides.

A avaliação da membrana plasmática da cabeça e do acrossoma dos espermatozoides das amostras de sêmen congelado/descongelado foi realizada com associação de duas sondas fluorescentes (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo), conforme proposto por Harrison e Vickers (1990). Após o descongelamento, as amostras de sêmen foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL (Eppendorf®) e incubadas em banho-maria a 37 °C. Em uma sala ao abrigo de luz, uma alíquota de 10 µL de sêmen foi adicionada e homogeneizada em 40 µL da solução de estoque contendo as duas sondas, em temperatura ambiente. Após cinco minutos de acondicionamento, uma alíquota de 10 µL da amostra foi colocada entre lâmina e lamínula e analisadas em microscopia de epifluorescência,

contabilizando-se 100 espermatozoides, classificados em íntegros, semilesados e lesados. Os espermatozoides íntegros coram-se pelo diacetato de carboxifluoresceína (verdes em toda extensão), os semilesados, o acrossomo e a membrana coram-se pelo diacetato de carboxifluoresceína, mas o núcleo cora-se com iodeto de propídio (vermelho) e os lesados coram-se de vermelho.

Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa estatístico SAEG, versão 9.1 (UFV, 2007). Para todas as características estudadas, realizou-se a estatística descritiva (médias, desvios-padrão e coeficiente de variação) e a correlação simples de Pearson.

Para os valores quantitativos, realizou-se o teste de Lilliefors e Cochran-Bartlett para verificar, respectivamente, a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Quando não atenderam às premissas da ANOVA, os dados foram analisados por análise não-paramétrica (Kruskal Wallis) e quando atendidas, empregou-se a ANOVA e aquelas que apresentarem diferenças significativas no teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com probabilidade de erro de 5%.

Para o teste de termorresistência, os dados obtidos com cada diluente foram analisados por análise de regressão para verificar o comportamento dos dados durante três horas de incubação e também pela ANOVA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sêmen *in natura*

O volume, motilidade espermática progressiva, vigor espermático, concentração espermática por mL, teste supravital, teste hiposmótico, defeitos espermáticos maiores e totais variaram entre os animais, porém não houve diferença entre os mesmos ($P > 0,05$) (TABELA 4). Entretanto, o turbilhonamento e o aspecto apresentaram diferenças entre os animais ($P < 0,05$), onde o touro 3 apresentou melhor aspecto seminal e diferiu dos touros 1 e 4 nos valores para turbilhonamento. Os defeitos espermáticos menores apresentaram diferenças entre os animais ($P < 0,05$) (TABELA 5), onde os espermatozoides do touro 4 apresentaram-se mais defeituosos em relação ao touro 1. Apesar destas diferenças, todos os parâmetros estão dentro da normalidade para a espécie bovina (CBRA, 1998). Os valores observados no presente estudo mostram que os touros utilizados se apresentaram excelentes e homogêneos quanto ao perfil seminal. Sendo os mesmos classificados como aptos à reprodução, respaldando este estudo quanto à utilização destes doadores na criopreservação dos espermatozoides.

TABELA 4. Aspectos físicos do sêmen *in natura* em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.

Touro	Aspecto (1 – 4)*	Volume* (mL)	Turbilhonamento (0 – 5)	Motilidade (%)	Vigor* (0 – 5)	Sptzx10 ⁶ /ml
1	3,0 ± 0,0 ^b	4,7 ± 0,7 ^a	2,8 ± 0,4 ^b	80,0 ± 4,7 ^a	3,8 ± 0,2 ^a	1.165,1 ± 89,9 ^a
2	3,1 ± 0,3 ^b	5,2 ± 1,3 ^a	3,1 ± 0,4 ^{ab}	80,0 ± 5,7 ^a	3,8 ± 0,3 ^a	1.199,6 ± 164,8 ^a
3	3,9 ± 0,3 ^a	5,5 ± 1,3 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	79,5 ± 10,1 ^a	3,5 ± 0,5 ^a	1.459,8 ± 305,2 ^a
4	3,2 ± 0,4 ^b	4,9 ± 2,1 ^a	3,0 ± 0,2 ^b	81,0 ± 6,5 ^a	3,8 ± 0,5 ^a	1.164,4 ± 194,9 ^a
Geral	3,3 ± 0,5	5,1 ± 1,4	3,1 ± 0,4	80,1 ± 6,8	3,7 ± 0,4	1.247,2 ± 232,5

* Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste Tukey (ANOVA); SPTZX10⁶/mL = concentração espermática por mL.

TABELA 5. Percentual de espermatozoides não corados no teste supravital, espermatozoides reativos no teste hiposmótico e das características morfológicas dos espermatozoides *in natura* em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.

Touro	Teste supravital (%)	Teste hiposmótico (%)	Defeitos espermáticos		
			Maiores (%)	Menores (%)	Totais (%)
1	80,6 ± 6,5 ^a	59,8 ± 4,9 ^a	5,8 ± 2,6 ^a	3,3 ± 1,6 ^b	9,2 ± 3,4 ^a
2	80,6 ± 5,8 ^a	60,1 ± 6,1 ^a	4,9 ± 2,7 ^a	4,4 ± 1,9 ^{ab}	9,3 ± 3,8 ^a
3	82,5 ± 10,5 ^a	60,1 ± 10,3 ^a	5,5 ± 2,4 ^a	3,7 ± 1,4 ^{ab}	9,2 ± 2,3 ^a
4	81,1 ± 7,0 ^a	61,0 ± 5,8 ^a	5,0 ± 2,5 ^a	5,6 ± 2,5 ^a	10,6 ± 3,4 ^a
Geral	81,2 ± 7,4	60,2 ± 6,8	5,3 ± 2,5	4,3 ± 2,0	9,6 ± 3,2

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os valores médios observados neste estudo para o aspecto físico do sêmen *in natura* são superiores aos padrões exigidos pelo CBRA (1998), onde os valores normais para a espécie bovina são de 5 mL de volume do ejaculado, turbilhonamento presente, 70 % de

motilidade e vigor espermático 3. Os valores médios do presente estudo corroboram os de Borges (2008) que avaliou o aspecto físico do sêmen *in natura* de touros da raça Nelore mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação Artificial. Martins et al. (2011) avaliaram a qualidade do sêmen *in natura* de touros da raça Nelore e observaram valores médios inferiores aos deste estudo para o turbilhonamento (2,9), motilidade espermática progressiva retilínea (78,5 %), vigor espermático (3,2), teste supravital (77,2 %) e concentração espermática (753 milhões/mL).

Houve correlação alta e positiva ($r = 0,74$) do aspecto com a concentração espermática por mL (TABELA 6), indicando que a avaliação macroscópica da densidade do ejaculado reflete na quantidade de espermatozoides. Houve correlação baixa e positiva do aspecto com o volume ($r = 0,26$), bem como, houve correlação baixa e positiva ($r = 0,33$) do volume com a concentração espermática por mL, mostrando que ejaculados coletados por meio da eletroejaculação podem ser obtidos com volumes altos e com concentrações espermáticas satisfatórias. Ejaculados obtidos por meio da vagina artificial apresentam volumes menores quando comparados com a eletroejaculação, porém com elevada concentração espermática por mL. A eletroejaculação estimula uma maior secreção de líquidos seminais provenientes das glândulas acessórias dos órgãos genitais internos masculinos, refletindo em ejaculados mais diluídos em relação aos obtidos por meio da vagina artificial. De acordo com Vasconcelos (2009), em bovinos, a ação da coleta com vagina artificial ou por eletroejaculação ocasiona mudanças significativas nos constituintes do plasma, como também a própria frequência de coletas.

TABELA 6. Correlações Simples de Pearson entre os aspectos físicos do sêmen *in natura*, espermatozoides não corados no teste supravital, espermatozoides reativos no teste hiposmótico e características morfológicas dos espermatozoides em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.

	ASP	VOL	TURB	MOT	VIG	SPTZx10 ⁶ /mL	SUPVIT	HOST	DFM	DFMEN	DFT
ASP	1	0,26	0,51	0,26	-0,33	0,74	NS	NS	NS	NS	NS
VOL		1	0,30	NS	NS	0,33	NS	NS	NS	NS	NS
TURB			1	NS	NS	0,38	NS	NS	NS	NS	NS
MOT				1	0,60	-0,48	0,35	0,98	NS	-0,27	NS
VIG					1	-0,53	0,23	0,85	NS	NS	NS
SPTZx10 ⁶ /mL						1	-0,29	-0,46	NS	NS	NS
SUPVIT							1	0,88	NS	-0,28	NS
HOST								1	NS	NS	NS
DFM									1	NS	0,77
DFMEN										1	0,63
DFT											1

NS = não-significativo a $P > 0,05$; ASP = aspecto; VOL = volume; TURB = turbilhonamento; MOT = motilidade espermática progressiva; VIG = vigor espermático; SPTZx10⁶/mL = concentração espermática por mL; SUPVIT = teste supravital; HOST = teste hiposmótico; DFM = defeitos espermáticos maiores; DFMEN = defeitos espermáticos menores; DFT = defeitos espermáticos totais.

A motilidade espermática apresentou correlação alta e positiva ($r = 0,98$) com o teste hiposmótico, média e positiva ($r = 0,60$) com vigor e, baixa e positiva ($r = 0,35$) com o teste supravital. O teste supravital apresentou correlação alta e positiva ($r = 0,88$) com o teste hiposmótico (TABELA 6). Estes resultados demonstram de certo modo, a acurácia na avaliação da motilidade espermática e teste supravital por meio de microscopia convencional, indicando grande percentual de espermatozoides vivos no sêmen *in natura*. Portanto, a avaliação da motilidade espermática, embora feita de forma subjetiva, quando feita por técnico previamente treinado, apresenta boa relação com a real qualidade seminal. Mayer et al. (1951) e Swanson e Bearden (1951) relatam que a utilização do teste supravital é indicado para avaliar a integridade estrutural da membrana dos espermatozoides no sêmen *in natura*, representando uma ferramenta auxiliar na avaliação da motilidade espermática. Houve correlação média e negativa ($r = -0,48$) entre a motilidade espermática progressiva e a concentração espermática por mL, bem como, correlação média e negativa ($r = -0,46$) do teste hiposmótico com a concentração espermática por mL (TABELA 6), indicando que os maiores números de espermatozoides vivos foram aqueles presentes em ejaculados de menor concentração. Este fato ocorreu pela frequência das coletas durante a metade final do experimento, conseqüentemente, menor tempo de estocagem na cauda do epidídimo, o que não ocorreu no início do estudo, onde os animais, apesar de terem sido submetidos a sessões de coletas para esgotar a reserva extra gonádica, vinham de um período de repouso sexual prolongado.

4.2. Sêmen pós-descongelado

As médias da motilidade do sêmen diluído (pré-resfriamento) em todos os diluentes utilizados, não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$), mostrando que os diluentes com diferentes concentrações de extrato líquido de melancia, em temperatura ambiente, mantiveram a viabilidade espermática após a diluição final.

A motilidade espermática progressiva no momento do descongelamento e no final do TTR apresentou diferença entre os diluentes ($P < 0,05$), onde as motilidades superiores foram obtidas pelos diluentes D1 e D2, e os menores foram obtidos pelos diluentes D3 e D4. No início do TTR, não houve diferença da motilidade no diluente D1 comparado ao diluente D2. Porém, a motilidade no diluente D1 foi maior que nos diluentes D3 e D4. A motilidade do diluente D2 não diferiu dos diluentes D3 e D4. Enquanto que no final do TTR (TABELA 7), não houve diferença da motilidade do diluente D1 com os diluentes D2 e D4, porém, houve diferença do diluente D1 com o diluente D3. Não houve diferença da motilidade do diluente D2 com os diluentes D3 e D4 ($P > 0,05$).

TABELA 7. Motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) e no pós-descongelamento durante o teste de termorresistência (TTR), de acordo com o diluente, em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.

Diluente	Motilidade no sêmen diluído (%)	Motilidade espermática (%) no TTR (horas)			
		0	1	2	3
1	82,4 ± 6,8 ^a	33,5 ± 7,6 ^a	28,2 ± 8,7 ^a	23,2 ± 8,4 ^a	19,0 ± 9,3 ^a
2	83,2 ± 6,5 ^a	30,0 ± 9,3 ^{ab}	26,5 ± 10,5 ^{ab}	22,6 ± 11,0 ^a	16,3 ± 10,1 ^{ab}
3	81,7 ± 6,9 ^a	25,0 ± 9,5 ^b	22,9 ± 9,3 ^{ab}	18,3 ± 9,2 ^a	13,4 ± 8,2 ^b
4	82,4 ± 7,2 ^a	25,8 ± 11,6 ^b	21,3 ± 10,2 ^b	18,1 ± 9,7 ^a	14,0 ± 9,2 ^{ab}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste Tukey; DILUENTE 1 = controle – diluente comercial Bovimix® - NUTRICELL; DILUENTE 2 = base Bovimix® + 25 % de extrato líquido de melancia; DILUENTE 3 – base Bovimix® + 50 % de extrato líquido de melancia; DILUENTE 4 = base 100 % de extrato líquido de melancia.

No momento do descongelamento, as médias de motilidade espermática observadas nos diluentes D1 e D2 estavam de acordo com os valores preconizados pelo CBRA (1998) (mínimo de 30 %). Porém, esses dois diluentes apresentaram uma diminuição mais acentuada na motilidade progressiva durante o teste de termorresistência (TABELA 7), quando comparadas com os diluentes D3 e D4. Enquanto que os diluentes D3 e D4, no momento do descongelamento, as médias de motilidade espermática foram inferiores aos valores preconizados pelo CBRA (1998). Porém, esses dois diluentes apresentaram uma diminuição menos acentuada em relação aos diluentes D1 e D2.

De acordo com os valores médios de motilidade espermática mínima pós-descongelamento (30 %) e após TTR de três horas (15 %), preconizados pelo CBRA (1998), somente os diluentes D1 e D2 foram aprovados quanto sua viabilidade para o uso nos programas de inseminação artificial.

Apesar dos diluentes contendo o extrato líquido de melancia não terem sido superiores ao controle no momento do descongelamento, os mesmos proporcionaram viabilidade dos espermatozoides após o congelamento/descongelamento. A presença de alguns componentes pode ter favorecido a criopreservação das amostras.

A presença do ferro (Fe) e cobre (Cu) em associação com o ácido ascórbico, na composição da melancia, pode ter favorecido para a diminuição da motilidade durante o TTR. Estes metais de transição associados ao ácido ascórbico são catalisadores de reações químicas (reação de Fenton) que favorecem a formação de ROS. Na presença de peróxido de hidrogênio, esses metais catalisam a reação para a formação do radical livre hidroxila, o mais reativo em sistemas biológicos. O radical hidroxila reage rapidamente com biomoléculas, desencadeando a peroxidação dos lipídios na membrana espermática pela separação de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados presentes na mesma. Nos diluentes D3 e D4, por apresentarem maior concentração de melancia, e conseqüentemente, maior

concentração de ácido ascórbico, a concentração desta vitamina pode ter perdido a sua função antioxidante, em virtude da presença do ferro e cobre. Esta associação do ácido ascórbico com um destes metais de transição o transforma em um pró-oxidante, levando a peroxidação lipídica (reação de Fenton). Segundo Ferreira e Matsubara (1997) e Halliwell e Gutteridge (1999), tanto a mistura Cu-ascorbato como Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos ao DNA, lipídios e proteínas celulares.

Siqueira et al. (2007) e Borges (2008), utilizando diluentes com base Tris em touros da raça Nelore, observaram valores superiores aos deste estudo, onde registraram, respectivamente, 53,4 e 52,1 % para a motilidade espermática progressiva retilínea ao descongelamento, e 33 e 34,4 % após a realização do TTR de 3 horas. Da mesma forma, esses valores corroboram os estudos de Martins et al. (2011), utilizando diluente com base Tris (BIOXCELL® - IMV) em touros da raça Nelore, que observaram 47,1 % de motilidade espermática progressiva retilínea no momento do descongelamento e 25,1 % no final do TTR. Mocé e Graham (2008) observaram pequena diminuição da motilidade progressiva retilínea espermática (de 47,6 % para 41 %) após as 3 horas de incubação no teste de termorresistência em sêmen de touros da raça Holandesa em central de inseminação artificial, utilizando diluente com base contendo citrato-gema.

O ácido ascórbico adicional (excedente e não reagente na reação de Fenton) e o carotenoide licopeno (antioxidante) podem ter atuado na redução de moléculas oxidativas como os peróxidos, prevenindo a formação de hidroperóxidos de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, estabilizando as membranas plasmáticas e protegendo as células espermáticas de danos oxidativos durante a criopreservação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG e ÁRNER, 2001; UYSAL e BUCAK, 2007; BANSAL e BILASPURI, 2011).

Borges (2008), criopreservando sêmen de bovinos com diluente contendo ácido ascórbico, observou excelentes resultados na motilidade espermática durante a hora 0 (75 %) e hora 3 (63 %) do teste de termorresistência. Foote et al. (2002) avaliaram a eficácia do ácido ascórbico (0,5 mg/L e 2,5 mg/L) sobre o sêmen resfriado (5 °C durante 24 horas) de touros da raça Holandesa, observando melhora na motilidade espermática (63 e 59 %, respectivamente). Zini et al. (2010) avaliaram a ação do licopeno com ou sem peróxido de hidrogênio sobre a motilidade e índice de fragmentação do DNA em espermatozoides humanos (sêmen *in natura*). Os autores observaram que o licopeno não melhorou a motilidade espermática com ou sem a presença do peróxido de hidrogênio, porém diminuiu o índice de fragmentação do DNA (29,8 vs. 8,0 %, respectivamente). Entretanto, a presença do peróxido de hidrogênio diminuiu a motilidade espermática (73 vs. 28 %), bem como, aumentou o índice de

fragmentação DNA espermático (11,1 vs. 29,8 %). Estes autores afirmam que estes antioxidantes surgem como alternativas viáveis para programas de criopreservação de sêmen. Em contrapartida, Uysal e Bucak (2007) observaram que o licopeno foi eficaz no aumento da motilidade espermática progressiva em sêmen descongelado de ovinos.

De acordo com Bansal e Bilaspuri (2008) e Bilaspuri e Bansal (2008), o manganês apresenta efeito antioxidante, aumentando a viabilidade, motilidade e capacitação espermática e reação acrossômica, diminuindo o estresse oxidativo. O manganês também melhora a concentração de AMPc, estimulando o Ca^{+2} ou Mg^{+2} ATPase que conduzem a ativação da abertura dos canais de cálcio, assim, depositando maior quantidade de Ca^{+2} intracelular (KIM e PARTHASARATHY, 1998).

A sacarose presente na melancia pode ter auxiliado no congelamento pela sua função crioprotetora e fornecimento energético aos espermatozoides. Crowe et al. (1987) e Woelders et al. (1997) relatam que a sacarose diminui os danos causados pela desidratação celular durante a criopreservação, por meio da estabilização da bicamada lipídica da membrana plasmática espermática, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e manutenção dos lipídios numa fase fluida na ausência de água.

Antes do início do estudo, foram realizados congelamentos piloto, sem o uso da máquina de congelamento (método artesanal), para testar a eficácia do diluente controle, bem como, a qualidade e homogeneidade seminal pós-congelamento em touros doadores. Nesta avaliação, todas as partidas (n=3) apresentaram qualidade satisfatória ao final do TTR, de acordo com os parâmetros exigidos pelo CBRA (1998). De acordo com os valores obtidos ao final do TTR deste estudo, sugere-se que o tempo de equilíbrio proposto pela empresa fabricante (Cryogen Dualflex – Neovet®; curva de resfriamento e congelamento na FIGURA 1), para a raça bovina, não foi totalmente eficaz para o congelamento do sêmen neste estudo, visto que, o diluente controle apresentou valores médios próximos aos valores mínimos (15%) preconizados pelo CBRA (1998) para sêmen congelado/descongelado no TTR.

Com relação ao vigor espermático, as médias no sêmen diluído (pré-resfriamento) e pós-descongelado, em todos os diluentes utilizados, não apresentaram diferença entre si ($P>0,05$) durante o TTR (TABELA 8). De acordo com os valores de vigor espermático mínimo pós-descongelamento (vigor 3) e após TTR de três horas (vigor presente), preconizados pelo CBRA (1998), todos os diluentes foram aprovados quanto sua viabilidade para o uso nos programas de inseminação artificial.

TABELA 8. Vigor espermático* do sêmen diluído (pré-resfriamento) e pós-descongelamento durante o teste de termorresistência (TTR) em cada diluente em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.

Diluente	Vigor no sêmen diluído (0 – 5)	Vigor espermático (0 – 5) no TTR (horas)			
		0	1	2	3
1	4,2 ± 0,4	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,4	2,4 ± 0,5	1,9 ± 0,6
2	4,3 ± 0,2	3,0 ± 0,4	2,7 ± 0,5	2,6 ± 0,6	2,2 ± 0,6
3	4,1 ± 0,4	2,9 ± 0,4	2,7 ± 0,5	2,4 ± 0,6	1,9 ± 0,6
4	4,3 ± 0,3	2,9 ± 0,5	2,6 ± 0,5	2,3 ± 0,5	1,9 ± 0,6

*(P>0,05) pelo teste Kruskal Wallis; DILUENTE 1 = controle – diluente comercial Bovimix® - NUTRICELL; DILUENTE 2 = base Bovimix® + 25 % de extrato líquido de melancia; DILUENTE 3 – base Bovimix® + 50 % de extrato líquido de melancia; DILUENTE 4 = base 100 % de extrato líquido de melancia.

A manutenção do vigor espermático ao longo do TTR nos diluentes contendo extrato líquido de melancia pode ser justificada pela presença de carboidratos (frutose, sacarose e glicose), auxiliando na atividade mitocondrial por meio de fornecimento de energia. Os espermatozoides bovinos apresentam a via metabólica baseado na rota aeróbica (HAMMERSTEDT, 1975). Quando comparado a outros sistemas biológicos verifica-se que a rota metabólica apresenta três pontos de controle estabelecidos por enzimas, hexoquinase, fosfrutoquinase e pirovatoquinase. Baseado nesta característica dos pontos de controle, os espermatozoides bovinos utilizam como substrato principal a frutose, visto que estas células não conseguem de forma eficiente produzir ATP a partir da glicose, posto que a quantidade destas enzimas seja reduzida inviabilizando a formação de frutose a partir de glicose, via glicolítica inicial (ISKEEP e HAMMERSTEDT, 1983). Portanto, as células espermáticas utilizam diretamente a via Embden-Meyerhof onde o ATP é consumido durante o metabolismo da frutose e reconvertido durante o metabolismo das trioses.

O metabolismo espermático, como todas as células biológicas, apresenta o metabolismo exógeno por substratos (glicose e frutose) que são transportados para dentro das células e direcionados, unicamente, para a via Embden-Meyerhof. De acordo com Iskeep e Hammerstedt (1983), as células espermáticas não apresentam enzimas para atuar na via das pentoses, nem para o metabolismo do glicogênio, a captação de substrato, por via exógena, é feita por receptores de membrana denominados GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5, que são distribuídos por toda membrana espermática. Os receptores GLUT3 e GLUT5 estão presentes na peça intermediária, o GLUT1 na peça principal e o GLUT2 na parte final da cauda e é caracterizado pela alta afinidade por frutose. O GLUT4 se expressa nas células germinativas, principalmente durante a espermatogênese (ANGULO et al., 1998). Quanto ao metabolismo endógeno, provavelmente, representado pela β -oxidação de ácidos graxos, provenientes de fosfolipídios, acredita-se que seja, limitado pela ação da enzima fosfolipase em razão da hidrólise, conversão de CoA-éster e transporte mitocondrial (MANN, 1975;

ISKEEP e HAMMERSTEDT, 1985). Todavia, estudos ainda estão sendo realizados para descrever melhor o metabolismo endógenos dos espermatozoides bovinos.

A presença de eletrólitos (cálcio, fósforo, sódio, potássio, manganês, magnésio e outros) no extrato líquido de melancia pode ter auxiliado no metabolismo espermático por controle de entrada e saída de componentes que vão favorecer a viabilidade e capacidade fecundante do espermatozoide. O íon cálcio pode se agregar com outras substâncias como o ácido cítrico ou ligado à proteína formando a calmodulina. Há indícios na literatura sobre o papel regulatório da calmodulina na concentração de cálcio intracelular e possivelmente, sobre a ação do AMP-cíclico. Assim, acredita-se que este complexo está diretamente relacionado a hormônios esteroides e receptores na membrana plasmática, visto que o cálcio tem a função fisiológica e bioquímica de segundo mensageiro. O zinco é outro eletrólito presente na melancia, que em conjunto com as protaminas, auxilia na estabilização do DNA espermático, bem como na manutenção da estabilidade estrutural da membrana e da motilidade espermática (MANN e LUTWAK-MANN, 1981).

TABELA 9. Percentual de espermatozoides não corados no teste supravital*, percentual de espermatozoides reativos no teste hiposmótico e epifluorescência e características morfológicas dos espermatozoides observados no momento do descongelamento durante o teste de termorresistência, de acordo com o diluente, em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.

Diluente	SUPVIT*	HOST	FINT	FSL	FLES	DFM	DFMEN	DFT
1	37,0 ± 10,8 ^a	32,6 ± 15,0 ^a	30,7 ± 13,2 ^a	15,7 ± 6,9 ^a	53,5 ± 16,7 ^a	6,4 ± 2,5 ^a	4,8 ± 1,0 ^a	11,2 ± 2,6 ^a
2	37,4 ± 17,5 ^a	27,0 ± 12,3 ^{ab}	25,2 ± 12,3 ^{ac}	13,3 ± 5,1 ^{ac}	61,4 ± 15,4 ^{ac}	6,3 ± 2,2 ^a	4,7 ± 1,6 ^a	11,0 ± 2,6 ^a
3	34,8 ± 14,8 ^a	23,2 ± 10,0 ^b	22,7 ± 9,5 ^{bc}	11,1 ± 4,7 ^{bc}	66,2 ± 12,7 ^{bc}	6,4 ± 1,5 ^a	5,7 ± 2,4 ^{ab}	12,1 ± 1,9 ^a
4	37,6 ± 19,5 ^a	21,5 ± 9,3 ^b	18,6 ± 10,6 ^b	8,8 ± 3,1 ^b	72,6 ± 11,7 ^b	6,8 ± 2,3 ^a	4,4 ± 1,7 ^{ac}	11,2 ± 3,5 ^a

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste Tukey; Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Kruskal Wallis; SUPVIT = teste supravital em %; HOST = teste hiposmótico em %; FINT: teste epifluorescência – espermatozoides íntegros; FSL = teste epifluorescência – espermatozoides semi-lesados; FLES = teste epifluorescência – espermatozoides lesados; DFM = defeitos espermáticos maiores em %; DFMEN = defeitos espermáticos menores em %; DFT = defeitos espermáticos totais em %; DILUENTE 1 = controle – diluente comercial Bovimix® - NUTRICELL; DILUENTE 2 = base Bovimix® + 25 % de extrato líquido de melancia; DILUENTE 3 – base Bovimix® + 50 % de extrato líquido de melancia; DILUENTE 4 = base 100 % de extrato líquido de melancia.

As médias dos espermatozoides vivos no teste supravital no momento do descongelamento, em todos os diluentes utilizados, não apresentaram diferença entre si (P>0,05) (TABELA 9), mostrando que os diluentes com diferentes concentrações de extrato líquido de melancia mantiveram a integridade estrutural da membrana e viabilidade espermática após o descongelamento. Em todos os diluentes deste estudo, o teste supravital no sêmen descongelado foi menor que o observado por Tanghe et al. (2002) (69,5%) em touros taurinos e Martins et al. (2011) (51,4 %) em touros da raça Nelore.

O teste hiposmótico apresentou diferença entre os diluentes ($P < 0,05$), onde valores superiores foram registrados no diluente D1, valor intermediário foi registrado no diluente D2 e valores inferiores foram registrados nos diluentes D3 e D4 (TABELA 9). Não houve diferença do diluente D1 com o diluente D2, bem como não houve diferença do diluente D2 com os diluentes D3 e D4 ($P > 0,05$). Porém, houve diferença do diluente D1 com os diluentes D3 e D4 ($P < 0,05$).

O teste de epifluorescência apresentou diferença entre os diluentes ($P < 0,05$), sendo que os valores médios para os espermatozoides íntegros, semi-lesados e lesados, não diferiram do diluente D1 com o diluente D2 ($P > 0,05$). Da mesma forma, não houve diferença entre os diluentes D2 e D3, bem como não houve diferença entre os diluentes D3 e D4 ($P > 0,05$). Porém, houve diferença do diluente D1 com os diluentes D3 e D4 ($P < 0,05$). Houve diferença do diluente D2 com os diluentes D4 ($P < 0,05$).

Nos testes hiposmótico e epifluorescência, os diluentes D3 e D4 foram inferiores ao diluente controle, sugerindo que a integridade funcional das membranas dos espermatozoides foi afetada pela reação de Fenton, com a formação de ROS. Coleghini (2005) avaliou a integridade de membrana de espermatozoides descongelados de touros da raça Simental e observou que o teste de epifluorescência é um dos métodos mais precisos na detecção da peroxidação lipídica espermática.

Os defeitos espermáticos maiores e totais variaram entre os tratamentos, porém não houve diferença entre os mesmos ($P > 0,05$) (TABELA 9). No entanto, os defeitos espermáticos menores apresentaram diferença entre os diluentes ($P < 0,05$), onde os maiores valores foram observados no diluente D3, enquanto que valores inferiores foram observados nos demais diluentes. Não houve diferença ($P > 0,05$) do diluente D1 com os demais diluentes. Porém, houve diferença do diluente D3 com o diluente D4 ($P < 0,05$).

Não houve diferença dos valores médios dos defeitos espermáticos do sêmen *in natura* com o sêmen descongelado, em todos os diluentes estudados. A maioria dos trabalhos não avalia a morfologia espermática no descongelamento. Isto mostra o efeito dos crioprotetores nos espermatozoides, mantendo a morfologia espermática dentro dos parâmetros normais da espécie.

No diluente 1, os valores obtidos no teste supravital apresentaram correlação média e positiva ($r = 0,49$) com a motilidade espermática. O teste hiposmótico apresentou correlação alta e positiva ($r = 0,89$) com os espermatozoides íntegros e correlação alta e negativa ($r = -0,80$) com os espermatozoides lesados observados no teste de epifluorescência (TABELA 10).

No diluente 2, os valores obtidos no teste hiposmótico apresentaram correlação alta e positiva ($r = 0,86$) com os espermatozoides íntegros, correlação alta e negativa ($r = -0,83$) com

os espermatozoides lesados e correlação média e positiva ($r = 0,41$) com os espermatozoides semi-lesados observados no teste de epifluorescência (TABELA 10).

No diluente 3, os valores obtidos no teste supravital apresentaram correlação baixa e positiva ($r = 0,33$) com a motilidade espermática. O teste hiposmótico apresentou correlação alta e positiva ($r = 0,82$) com os espermatozoides íntegros, correlação alta e negativa ($r = -0,80$) com os espermatozoides lesados e correlação média e positiva ($r = 0,51$) com os espermatozoides semi-lesados observados no teste de epifluorescência (TABELA 10).

No diluente 4, os valores obtidos no teste supravital apresentaram correlação média e positiva ($r = 0,46$) com a motilidade espermática. O teste hiposmótico do diluente 4 apresentou correlação alta e positiva ($r = 0,83$) com os espermatozoides íntegros e correlação alta e negativa ($r = -0,85$) com os espermatozoides lesados e correlação baixa e positiva ($r = 0,38$) com os espermatozoides semi-lesados observados no teste de epifluorescência (TABELA 10).

Observou-se neste estudo que o teste hiposmótico apresentou correlação com o teste de epifluorescência em todos os diluentes estudados, mostrando que estes testes devem ser realizados como ferramentas indispensáveis na avaliação da integridade funcional da membrana espermática para a detecção de possível ocorrência da peroxidação lipídica nos espermatozoides congelados/descongelados.

Apesar de a motilidade espermática ser o melhor parâmetro em prever a viabilidade espermática de sêmen congelado para uso em programa de inseminação artificial, parece não ser isoladamente eficaz em prever a qualidade da membrana no pós-descongelamento, em decorrência da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Sendo assim, necessário uso de testes complementares para que possam aumentar a acurácia em prever a fertilidade do sêmen e as relações dos mesmos com a taxa de não retorno ao estro.

TABELA 10. Correlações Simples de Pearson entre as médias gerais na motilidade e vigor espermático do sêmen, nos testes supravital, hiposmótico e epifluorescência e características morfológicas dos espermatozoides observados no momento do descongelamento durante o teste de termorresistência, de acordo com o diluente, em touros adultos da raça Nelore criados em regime semi-intensivo.

<i>DILUENTE 1</i>	MOT	VIG	SUPVIT	HOST	FINT	FSL	FLES	DFM	DFMEN	DFT
MOT	1	NS	0,49	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VIG		1	NS	-0,29	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SUPVIT			1	NS	0,31	NS	NS	NS	NS	NS
HOST				1	0,89	NS	-0,80	NS	NS	NS
FINT					1	0,36	-0,92	NS	NS	NS
FSL						1	-0,69	0,37	NS	0,30
FLES							1	NS	NS	NS
DFM								1	NS	0,92
DFMEN									1	0,35
DFT										1

<i>DILUENTE 2</i>	MOT	VIG	SUPVIT	HOST	FINT	FSL	FLES	DFM	DFMEN	DFT
MOT	1	0,68	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VIG		1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SUPVIT			1	NS	NS	0,27	-0,26	NS	NS	NS
HOST				1	0,86	0,41	-0,83	NS	-0,29	NS
FINT					1	0,47	-0,95	NS	NS	NS
FSL						1	-0,71	NS	NS	NS
FLES							1	NS	NS	NS
DFM								1	NS	0,78
DFMEN									1	0,55
DFT										1

<i>DILUENTE 3</i>	MOT	VIG	SUPVIT	HOST	FINT	FSL	FLES	DFM	DFMEN	DFT
MOT	1	0,68	0,33	NS	-0,31	NS	0,31	NS	NS	NS
VIG		1	NS	-0,31	-0,32	NS	0,30	NS	NS	NS
SUPVIT			1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HOST				1	0,82	0,51	-0,80	NS	NS	NS
FINT					1	0,53	0,95	NS	NS	NS
FSL						1	-0,77	NS	NS	NS
FLES							1	NS	NS	NS
DFM								1	-0,62	NS
DFMEN									1	0,76
DFT										1

<i>DILUENTE 4</i>	MOT	VIG	SUPVIT	HOST	FINT	FSL	FLES	DFM	DFMEN	DFT
MOT	1	0,64	0,46	NS	NS	NS	NS	-0,29	NS	NS
VIG		1	0,34	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SUPVIT			1	NS	0,34	NS	-0,33	NS	NS	NS
HOST				1	0,83	0,38	-0,85	NS	NS	NS
FINT					1	NS	-0,96	NS	NS	NS
FSL						1	-0,46	NS	NS	NS
FLES							1	NS	NS	NS
DFM								1	0,51	0,90
DFMEN									1	0,83
DFT										1

NS = não-significativo a $P > 0,05$; MOT = motilidade espermática progressiva; VIG = vigor espermático; SUPVIT = teste supravital; HOST = teste hiposmótico; FINT: teste epifluorescência – espermatozoides íntegros; FSL = teste epifluorescência – espermatozoides semi-lesados; FLES = teste epifluorescência – espermatozoides lesados; DFM = defeitos espermáticos maiores; DFMEN = defeitos espermáticos menores; DFT = defeitos espermáticos totais; DILUENTE 1 = controle – diluente comercial Bovimix® - NUTRICELL; DILUENTE 2 = base Bovimix® + 25 % de extrato líquido de melancia; DILUENTE 3 – base Bovimix® + 50 % de extrato líquido de melancia; DILUENTE 4 = base 100 % de extrato líquido de melancia.

5. CONCLUSÕES

- Nas concentrações de 50 e 100 %, o extrato líquido de melancia não se mostrou eficaz na manutenção da integridade e viabilidade espermática pós-descongelamento;

- A concentração de 25 % de extrato líquido de melancia manteve a integridade estrutural da membrana dos espermatozoides durante o processo de criopreservação, bem como sua viabilidade após o teste de termorresistência, podendo ser uma alternativa na composição de diluentes para criopreservação de sêmen bovino.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497-506, 2001.

AITKEN, R.J. Founders'lecture - Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 655-664, 2004.

ALVARENGA, M.A.R.; RESENDE, G. M. **Cultura da melancia**. Lavras: UFLA. 2002. 132 p.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Ed.) **Equine reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, 1993. p.715-745.

AMANN, R.P; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

ANGULO, C.; RAUCH, M.C.; DROPELMAN, A. et al. Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 71, p. 189-203, 1998.

ASHIZAWA, K.; OZAWA, Y.; OKAUCHI, K. Comparative studies of elemental composition on ejaculated fowl, bull, rat, dog and boar spermatozoa by electron probe X-ray microanalysis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 2, p. 269-272, 1987.

AURICH, J.E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H. et al. Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.

BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V. et al. Catalase activity in equine semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 1026-1030, 2000.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Effect of manganese on bovine sperm motility, viability, and lipid peroxidation in vitro. **Animal Reproduction**, v. 5, n. 3-4, p. 90-96, 2008.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1025-1033, 2002.

BILASPURI, G.S.; BANSAL, A.K. Mn²⁺: a potent antioxidant and stimulator of sperm capacitation and acrosome reaction in crossbred cattle bulls. **Archiv fur Tierzucht**, v. 51, n. 2, p. 149-156, 2008.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N. et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1105-1122, 2002.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinariaer Medicin**, v. 25, p. 383-392, 1973.

BORGES, J.C. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro*. 2008. 70 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

BROUWERS, J.F.H.M.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1382-1391, 2003.

COLEGHINI, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal, mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo,

SP.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p. 721-731, 1997.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v. 42, p. 351-360, 1994.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F. Stabilization using dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemistry Journal**, v. 242, p. 1-10, 1987.

CUNHA, I.C.N. Criopreservação do sêmen de cães. 2002. 144 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 30, p. 32-44, 1993.

EMBRAPA. Sistema de produção da melancia. Nº 6. Petrolina, PE: EMBRAPA Semi-árido, 2010. Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/index.htm>>. Acesso em: 25 de setembro de 2011.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v. 3, p. 1-13, 1996.

FAO. *Sandia: composición nutricional*. Disponível em: <http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/SANDIA.HTM>. Acesso em: 01 de novembro de 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1997.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 25, p. 473-484, 1986.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W.; PANICH, P.L. Glycerol equilibration time revisited. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 141-146, 1996.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13-23, 2002.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo, Varela, 2002.

GONZALEZ, R.A.F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino. 2004. 92 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7^aed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: New York, 1999. 936 p.

HAMMERSTEDT, R.H. Tritium release from [2-3H] D-glucose as a monitor of glucose consumption by bovine sperm. **Biology of Reproduction**, v. 12, p. 545-551, 1975.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-86, 1990.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v.76, p.84-97, 1957.

HARRISON, R.A.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-52, 1990.

HINSCH, E.; HINSCH, K.D.; BOEHM, J.G. et al. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk and egg-yolk containing extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 32, p. 143-149, 1997.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000a.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000b.

HOLT, W.V. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoa. **International Review of Cytology**, v. 87, p. 159-194, 1984.

HOLT, W.V; NORTH, R.D. Determination of lipid components and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 73, n. 1, p. 285-294, 1985.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145-169, 2003.

INSKEEP, P.B.; HAMMERSTEDT, R.H. A colorimetric method to assess endogenous metabolism and its application to the study of bovine sperm. **Journal of Biochemistry and**

Biophysics Methods, v. 7, n. 3, p. 199-210, 1983.

INSKEEP, P.B.; HAMMERSTEDT, R.H. Endogenous metabolism by sperm in response to altered cellular ATP requirements. **Journal of Cellular Physiology**, v. 123, p. 180-190, 1985.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SODERQUIST, L. et al. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, v. 53, p. 859-875, 2000.

JONES J. R.; WOLF, B.; MILLS, H. A. **Plant analysis handbook: a practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide**. Athens: Micro Macro Publishing, 1991. 213 p.

KIM, J.G.; PARTHASARATHY, S. Oxidation and the spermatozoa. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v. 16, n. 4, p. 235-239, 1998.

KRZYZOSIAK, J.; EVENSON, D.; PITT, C et al. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, n. 6, p. 251-261, 2000.

MACK, S.R; EVERINGHAM, J.; ZANEVELD, L.J.D. Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v. 240, n. 1, p. 125-136, 1986.

MANN, T. Biochemistry of stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 47-52, 1975.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen general features of the seminal plasma**. 2^a. ed. New York: Springer-Verlag, 1981. p. 28-34.

MARQUES, A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. et al. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.

MARTINS, L.F.; PINHO, R.O.; PARAIZO, R.M. et al. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 7, p. 1519-1525, 2011.

MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42:1-4, p. 55-65, 1996.

MAYER, D.T.; SQUIERS, C.D.; BOGART, R. et al. The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. **Journal of Animal Science**, v. 10, p. 206-235, 1951.

MAYER, D.T.; SQUIERS, C.D.; BOGART, R.; OLOUFA, M.M. The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. **Journal of Animal Science**, v. 10, p. 206-235, 1951.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104-118, 2008.

MORENO, F.A.B.; BISPO, C.A.S.; GUERRA, M.M.P. et al.. Motilidade, vigor e dosagem de Aspartato Amino Transferase no sêmen caprino diluído em leite desnatado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 460-462, 2001.

MORI, E.E.M. Suco de melancia [*Citrullus lanatus* (Tunberg) Matsumura and Nakai]: processamento, formulação, caracterização física, química, microbiológica e aceitabilidade. 1996. 100 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

NEOVET Indústria Comércio e Serviços Ltda. **Manual de operações – Cryogen Dualflex**. Uberaba, MG, 2008, 27 p.

NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 399-420, 1999.

OHATA, P.M.; BERNARDI, M.L.; REIS, G.R. et al. Congelabilidade do sêmen suíno de acordo com o período de equilíbrio pré-congelamento e da sensibilidade ao resfriamento **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 69-74, 2005.

PARKS, J.E.; MEACHAM, T.N.; SAACKE, R.G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. I. Selection of a PIPES - buffered diluent for evaluating the effect of egg yolk lipoproteins on sperm cholesterol and phospholipids. **Biology of Reproduction**, v. 24, n. 2, p. 393-398, 1981.

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

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

RATH, L.C.; TARNEJA, R.; SINGH, M.S. Effect of cryopreservation on semen sample **Medical Journal Armed Forces India**, v. 60, n. 1, p. 42-44, 2004.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 77-86, 1994.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P. et al. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 387-395, 2007.

SMITH, J.F.; MURRY, G.R. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 57, p. 246-250, 1997.

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

- SOUZA, F. F.; DIAS, R.C.S.; QUEIRÓZ, M.A. Aspectos botânicos. In: SOUZA, F.F. (Ed.). **Cultivo da melancia em Rondônia**. Porto Velho: EMBRAPA Rondônia, 2008. p. 82-95.
- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K. et al. Cooled and frozen Stallion Semen, Fort Collins: Animal reproduction biotechnology laboratory. **Bulletin** n. 9, 1999.
- SWANSON, E.W.; BEARDEN, H.J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 10, p. 981-987, 1951.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; STERCKX, V. et al. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 127-137, 2002.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG**. Versão 9.1. Viçosa, MG, 2007, 142 p.
- UYSAL, O.; BUCAK, M.N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. **Acta Veterinaria Brno**, v. 76, p. 383-390, 2007.
- VASCONCELOS, A.B. Bioquímica do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 32-35, 2009.
- VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; BAME, J.H. et al. Effect of scrotal insulation on viability of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3827-3835, 1991.
- WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 141-146, 1996.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- WILHELM, K.M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. **Theriogenology**, v. 46, p. 559-578, 1996.

WOLDERES, H.; MATHIJS, A.; ENGEL, B. Effects of trehalose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of sperm after freezing and thawing. **Cryobiology**, v. 35, p. 93-105, 1997.

ZINI, A.; SAN GABRIEL, M.; LIBMAN, J. Lycopene supplementation in vitro can protect human sperm deoxyribonucleic acid from oxidative damage. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 3, p. 1033-1036, 2010.