

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

UTILIZAÇÃO DO TESTE HIPOSMÓTICO NA AVALIAÇÃO DO SÊMEN  
REFRIGERADO DE PEQUENOS RUMINANTES

ALLAN KARISTON BORGES SILVA

PATOS-PB  
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

UTILIZAÇÃO DO TESTE HIPOSMÓTICO NA AVALIAÇÃO DO SÊMEN  
REFRIGERADO DE PEQUENOS RUMINANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro

Mestrando: Allan Kariston Borges Silva

PATOS-PB

2010

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO  
CAMPUS DE PATOS - UFCG

S117s  
2010

Silva, Allan Kariston Borges.

Utilização do teste hiposmótico na avaliação do sêmen refrigerado de pequenos ruminantes. / Allan Kariston Borges Silva. – Patos-PB: CSTR/UFCG, 2010.

44p

Orientador (a): Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro

Dissertação Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

1 - Caprino – Ovino – Dissertação. 2 - Reprodução animal. 3- Sêmen.

CDU: 636.082.45: 636.3(043.3)

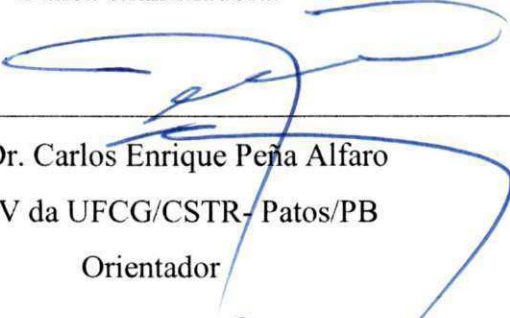
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

UTILIZAÇÃO DO TESTE HIPOSMÓTICO NA AVALIAÇÃO DO SÊMEN  
REFRIGERADO DE PEQUENOS RUMINANTES

Dissertação elaborada por  
ALLAN KARISTON BORGES SILVA

Aprovada em:

Banca examinadora:



---

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro  
UAMV da UFCG/CSTR- Patos/PB  
Orientador



---

Dra. Ângela Maria Xavier Eloy

EMBRAPA – Sobral/CE

Examinador



---

Dr. Rômulo José Vieira

FACID – Teresina/PI

Examinador

Patos-PB

2010

*Dedico esse trabalho, à aquele que desde os primeiros minutos de vida me ensina a ser uma pessoa melhor, meu filho: **José Antônio Kariston.***

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, por me oferecer sabedoria, fé, humildade e os animais, pois sem eles nada disso seria possível.

À minha mãe, por tudo que fez e faz por mim.

À minha esposa, pela paciência, dedicação e amor.

À toda minha família, pelo carinho e amor mesmo de longe.

Ao Professor Carlos Peña pela orientação, grande amizade, conselhos e confiança.

À Professora Graça, meu “anjo da guarda”, meu muito obrigado!!!

À Professora Norma, pela amizade.

Aos amigos que me ajudaram na conclusão desse projeto: Aline, Marquiliano, Cristiane, Vera Lúcia, Lucas e Anne Kaliny.

Aos Colegas de Mestrado: Dalana, Dalvinha, Cláudia Morgana, Elisângela por tudo que passamos nessa caminhada.

A todos os Professores da Pós-Graduação, pelos ensinamentos e orientação, em especial à Professora Rosane.

## SUMÁRIO

	Pág.
Lista de quadros .....	06
Introdução .....	07
Capítulo I Utilização de diversas soluções hiposmóticas na avaliação de sêmen caprino refrigerado diluído em água de coco em pó .....	09
Abstract .....	10
Resumo .....	11
Introdução.....	11
Material e Métodos .....	13
Resultados .....	14
Discussão .....	15
Referências.....	19
Capítulo II Utilização de diversas soluções hiposmóticas na avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e em leite em pó desnatado.....	22
Abstract .....	23
Resumo .....	24
Introdução .....	24
Material e Métodos .....	26
Resultados .....	28
Discussão .....	29
Referências.....	35
Considerações Finais .....	38
Anexos .....	39
1. Instruções aos autores da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira .....	40

Lista de quadros

	Pág.
Capítulo I	
Utilização de diversas soluções hiposmóticas na avaliação de sêmen caprino refrigerado diluído em água de coco em pó	
Quadro 1	
Motilidade individual progressiva dos espermatozóides de bodes Moxotó diluídos em água de coco em pó em diferentes períodos pós-resfriamento, Patos-PB, 2010...	18
Quadro 2	
Vigor dos espermatozóides de bodes Moxotó diluídos em água de coco em pó em diferentes períodos pos-resfriamento, Patos-PB, 2010.....	18
Quadro 3	
Percentual de espermatozóides reativos ao teste HOST no sêmen de bodes Moxotó diluído em água de coco em pó e refrigerado à 5°C quando submetidos a três diferentes soluções hiposmóticas, Patos-PB, 2010 .....	19
Capítulo II	
Utilização de diversas soluções hiposmóticas na avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e em leite em pó desnatado	
Quadro 1	
Motilidade individual progressiva dos espermatozóides de carneiros Santa Inês diluídos em água de coco em pó e leite em pó desnatado em diferentes períodos pós-resfriamento. Patos-PB 2010 .....	33
Quadro 2	
Vigor dos espermatozóides de carneiros Santa Inês diluídos em água de coco em pó e leite em pó desnatado em diferentes períodos pós-resfriamento. Patos-PB 2010.....	33
Quadro 3	
Percentual de espermatozóides reativos ao teste HOST no sêmen de carneiros Santa Inês diluído em água de coco em pó e em leite em pó desnatado e refrigerado à 5°C quando submetidos a duas soluções hiposmóticas..	34



## INTRODUÇÃO

As criações caprina e ovina desempenham importante papel socioeconômico no Nordeste brasileiro, uma vez que representam uma das alternativas de produção para pequenos e médios produtores rurais. O rebanho estimado na região é de 10,4 milhões e 9 milhões de cabeças de caprinos e ovinos, respectivamente, representando 93 e 56% do efetivo nacional (IBGE 2005).

As características dos sistemas de criação de produção caprina e ovina na região, apresentam baixos índices produtivos, em decorrência principalmente, de práticas de manejo inadequadas, má condição sanitária, baixa capacidade de investimento, irregularidades na disponibilidade de alimentos ao longo do ano, baixa capacidade de absorção tecnológica das propriedades, entre outros fatores (Santos et al. 2008).

A introdução de raças caprinas e ovinas especializadas para produção de carne e leite vem aumentando o interesse, por parte dos criadores, o que exige a adoção de práticas de manejo e tecnologias que possibilitem um maior aproveitamento do potencial genético dos rebanhos, e com isso propiciar o aumento da produção de carne e leite (Peña-Alfaro 2006).

De acordo com Simplício & Simplício (2008), a adoção de tecnologias reprodutivas, a exemplo da inseminação artificial, tem sido utilizada em pequena escala na região, embora, dado o aspecto populacional expressivo, exista um grande potencial do uso das mesmas, ao considerar que estas técnicas constituem importantes ferramentas da produção animal para propiciar melhoramento genético dos rebanhos.

Visando melhorar o desempenho dos índices de fertilidade com o uso da inseminação artificial têm sido propostos novos diluentes, entre estes destaca-se o diluente a base de água de coco em pó, o qual tem apresentado diversas vantagens no uso tanto na espécie caprina como ovina (Nunes 1998, Salgueiro et al. 2001).

No processo de tecnologia do sêmen refrigerado ou congelado, a avaliação dos efeitos da manipulação sobre a qualidade espermática, principalmente a agressão sobre a integridade da membrana plasmática, assume papel de grande importância na identificação de fatores que limitem os índices de fertilidade. Em decorrência disso, torna-se necessário avaliar de forma simples a integridade da membrana plasmática (Andrade 2007).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides do sêmen caprino e ovino diluído em água de coco em

pó e leite em pó desnatado, através do uso do teste hiposmótico com diversas soluções e osmolaridades, assim como avaliar parâmetros seminais em diversos períodos de conservação a 5° C no sêmen de caprinos e ovinos.

## REFERÊNCIAS

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Censo Agropecuário 2005. Disponível em: < [www.ibge.br/sidra](http://www.ibge.br/sidra) > Acesso em: 20 Jun. 2009.
- Nunes J.F. 1998. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina. Anais I Congresso Nordeste de Produção Animal, Fortaleza, CE.
- Peña-Alfaro, C. E. 2006. Apontamentos Curso de Reprodução de pequenos ruminantes, Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária de Ruminantes e Equídeos, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 25 p.
- Salgueiro C.C., Nunes J.F. & Oliveira K.L. 2002. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó na inseminação programada de cabras. Rev. Bras. Repro. Anim. 5:96-98.
- Santos, T.C.P. 2008. Caracterização dos sistemas de criação de caprinos e ovinos no semi-árido da Paraíba. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 65p.
- Simplício A.A & Simplício, K.M.M.G. 2008. Agronegócio da caprinocultura e da ovinocultura de corte. IV Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal, Imperatriz, MA.

## CAPÍTULO I

Utilização de diversas soluções hiposmóticas na avaliação de sêmen caprino refrigerado diluído em água de coco em pó

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, de acordo com o que estabelece as Normas de 11 de Julho de 2008, do Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos - PB.

## Utilização de diversas soluções hiposmóticas na avaliação de sêmen caprino refrigerado diluído em água de coco em pó<sup>1</sup>

Allan K. B. Silva<sup>2\*</sup>, Carlos E. P. Alfaro<sup>2</sup>, Lucas B. Batista<sup>2</sup>, Aline G. Mamede<sup>2</sup>, José F. Nunes<sup>3</sup>, Cristiane C. de M. Salgueiro<sup>3</sup>, Vera L. de L. Torres<sup>2</sup>.

ABSTRACT – Silva A.K.B., Peña-Alfaro C.E., Batista L.B. Mamede A.G., Nunes J.F., Salgueiro C.C. de M. & Torres V.L.L. 2009. [Use of various solutions hypoosmotic in the evaluation of semen goat refrigerated diluted in coconut water powder.]

Utilização de diversas soluções hiposmóticas na avaliação de sêmen caprino refrigerado diluído em água de coco em pó *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Hospital de Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, 58700-970 Patos, PB, Brazil. E-mail: [allankariston@yahoo.com.br](mailto:allankariston@yahoo.com.br)

The present work had as objective to evaluate the use of different solutions hypoosmotic to perform the hypoosmotic test (HOST) in assessing the semen goat three reproducers animals of Moxotó breed, diluted in coconut water powder and kept under refrigeration at 5°C. Two sodium citrate and fructose based solutions were used with osmolarities of 150 and 300 mOsmol/L and a solution of distilled water. Four semen collected were harvests in each reproducer, being evaluated against macroscopic and microscopic characteristics and submitted to the test HOST after 12, 24 and 48 hours post-refrigeration. The results showed that the individual progressive motility and vigor have not suffered significant differences up to 24 hours post-refrigeration. There were no changes between the different osmolarity hypoomotic solutions in assessing the integrity of goat semen sperm membrane.

INDEX TERMS: sperm, goat, hiposmotic test, chilled semen

---

<sup>1</sup> Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup> Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, 58700-970, Patos, PB, Brasil. \*Autor para correspondência: [allankariston@yahoo.com.br](mailto:allankariston@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> PPGCV – Universidade Estadual do Ceará

**RESUMO** – O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de diferentes soluções hiposmóticas para realizar o teste hiposmótico (HOST) na avaliação do sêmen caprino de três reprodutores da raça Moxotó, diluído em água de coco em pó e mantidos sob refrigeração à 5°C. Foram utilizadas duas soluções hiposmóticas à base de citrato de sódio e frutose com osmolaridade de 150 e 300 mOsmol/L e uma solução de água destilada. Foram realizadas quatro colheitas de sêmen em cada reprodutor, sendo este avaliado quanto às características macroscópicas e microscópicas e submetidos ao teste HOST após 12, 24 e 48 horas pós-refrigeração. Os resultados mostraram que a motilidade individual progressiva e o vigor não sofreram diferenças significativas até 24 horas pós-refrigeração. As soluções hiposmóticas com osmolaridades diferentes não apresentaram diferenças na avaliação da integridade de membrana espermática do sêmen caprino.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** espermatozóide, caprinos, teste hiposmótico, sêmen refrigerado.

## INTRODUÇÃO

O sêmen caprino pode ser usado na inseminação artificial fresco, resfriado ou congelado. Os sêmens fresco e o resfriado apresentam fertilidade mais elevada, em virtude de menos dano das células espermáticas motivados pelo processo de congelação e descongelação verificado no uso da técnica do congelação de sêmen, no entanto, o sêmen congelado pode ser mantido por um longo período armazenado em nitrogênio líquido, apresentando maior aplicabilidade (Traldi 2006).

Um diluente usado atualmente com sucesso para preservação do sêmen é a água de coco (*Cocus nucifera*), uma solução estéril, contendo sais, proteínas, açúcares, vitaminas, minerais, fatores de crescimento e gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhes confere densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, fornecendo, desta forma, os nutrientes necessários para manter a sobrevivência dos gametas criopreservados. O ácido 3-indol-acético é um fitormônio que estimula o crescimento dos vegetais, o qual foi isolado primeiramente por Nunes & Combarous (1995), descobrindo que esta substância promoveu incremento na motilidade do espermatozóide.

A avaliação do sêmen está baseada em diversos critérios que visam estabelecer correlação com as taxas de fecundação. Os testes mais utilizados são a avaliação da motilidade individual progressiva, o vigor e a morfologia espermática. Entretanto, a análise destas características espermáticas pode apresentar baixas correlações com a fertilidade (Amann 1989, Kumi-Diaka 1993).

A análise de integridade estrutural e funcional da membrana espermática é importante para a viabilidade e capacidade de fertilização do espermatozóide. A coloração com o azul de trypan e a eosina são os métodos usualmente empregados para avaliação da integridade da membrana, porém avaliam apenas a integridade estrutural e não a funcional da membrana plasmática. A avaliação funcional da membrana pode ser usada como um indicador da capacidade de fertilização do espermatozóide, e é baseado no comportamento da célula espermática frente a um meio hiposmótico. Na tentativa de equilibrar os meios extra e intracelular, ocorre um influxo de água através da membrana, provocando um edema. Com o edema, a cauda se “enrola” e esta alteração é facilmente visualizada tanto em microscopia óptica como microscopia de contraste de fase, sendo característica de integridade funcional da membrana (Jeyendran et al. 1984).

Em diversas espécies, o teste hiposmótico tem sido utilizado para avaliar a integridade da membrana plasmática após resfriamento ou congelamento, testando diversas soluções, tempo de incubação, adição de formol à solução hiposmótica (Alves et al 2004) ou diversos diluentes (Andrade 2007).

Deste modo, o presente trabalho objetivou comparar o uso de soluções com osmolaridades diferentes, na avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides, a partir do sêmen caprino refrigerado diluído em água de coco em pó e mantido em diversos períodos de conservação a 5°C, assim como a avaliação da motilidade individual progressiva e do vigor espermático.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal, localizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos/PB. Foram utilizados três reprodutores caprinos da raça Moxotó, com idade entre 12 e 24 meses, fertilidade comprovada e bom estado de saúde geral. Os animais foram vermifugados e mantidos em baias coletivas, recebendo alimentação a base de capim elefante (*Pennisetum purpureum*), suplementação balanceada com farelo de soja, farelo de milho, farelo de caroço de algodão, farelo de trigo, milho triturado, uréia, calcário calcítico, fosfato bicálcico, mistura vitamínico-mineral, sal iodado e água *ad libitum*.

Foram realizadas quatro colheitas de sêmen de cada reprodutor, com intervalo de uma semana, por meio de eletroejaculação. Após a colheita o ejaculado foi imediatamente colocado em banho-maria à 37°C e submetido à avaliação de suas características macroscópicas (volume, cor e aspecto) e microscópicas (motilidade individual progressiva, vigor, concentração e morfologia espermática). Apenas ejaculados com volume mínimo de 0,5 mL, motilidade individual progressiva maior ou igual a 75% e vigor maior ou igual a 3 foram utilizados no experimento.

O ejaculado foi diluído em diluente à base de água de coco em pó (ACP-102<sup>®</sup>) na proporção de 1:9 e depois o sêmen foi colocado na geladeira para resfriamento a uma temperatura média de 5°C. A motilidade individual progressiva e o vigor do sêmen diluído e refrigerado foram avaliadas após 12, 24 e 48 horas de conservação.

Para avaliação da reação ao teste hiposmótico foram testados três soluções: solução de citrato de sódio e frutose com osmolaridade de 150 mOsmol/L, solução de citrato de sódio e frutose com osmolaridade de 300 mOsmol/L e água destilada. Uma alíquota de 20 µl de sêmen diluído refrigerado foi colocado em tubos ependorf contendo 1 mL das soluções antes citadas, designados de soluções A, B, e C respectivamente. As amostras foram colocadas em banho Maria a 37°C durante 30 minutos. Em seguida foi preparada uma lâmina de cada uma das diluições do sêmen para exame microscópico com objetiva de imersão, onde foram avaliadas 200 células por amostra e o resultado expresso em percentual. Este procedimento foi realizado as 12, 24 e 48 horas após o resfriamento a 5°C.

Para interpretação da reação hiposmótica, os espermatozóides foram examinados considerando as alterações morfológicas da cauda, conforme descrito por Kumi-Diaka (1993). O cálculo do número de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico foi realizado por intermédio da fórmula citada por Melo (1999),  $HOST\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste hiposmótico})$ . Nesta fórmula todas as alterações de cauda, associadas ou não a defeitos de outra região do espermatozóide foram computadas antes e depois do teste hiposmótico.

Para análise dos dados foi utilizado o programa InStat 3 para as três variáveis de estudo. A motilidade individual progressiva e a reação ao teste hiposmótico foram analisadas através de análise de variância e as diferenças comparadas pelo teste de Student o vigor foi analisado pelo teste não paramétrico de Friedman, considerando uma probabilidade de 5%.

## RESULTADOS

Verifica-se no Quadro 1, que a motilidade individual progressiva com o diluente a base de água de coco em pó sofreu uma redução em relação os valores do sêmen fresco e do sêmen diluído refrigerado. A motilidade individual progressiva do sêmen fresco foi superior à observada nos momentos com 12 h ( $P < 0,05$ ), 24 h ( $P < 0,001$ ) e 48 h ( $P < 0,001$ ) de avaliação pós-diluição e refrigeração. Esta redução se deve, provavelmente, ao estresse sofrido pelo sêmen, em virtude das condições do processo de diluição e refrigeração. Observou-se, ainda, uma redução da motilidade individual progressiva a partir das 24 horas de resfriamento, sem diferença significativa nos intervalos de 12 e 24 horas, porém com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre estes e 48 horas pós-refrigeração.

O Quadro 2 mostra os resultados da avaliação espermática considerando o vigor, onde não ocorreram variações significativas ( $P < 0,05$ ) entre o sêmen fresco e os momentos de 12 e 24 horas, o que não foi observado quando comparados os intervalos de 12 e 24 horas com 48 horas pós-refrigeração.

Na análise da reação hiposmótica das soluções A (citrato de sódio e frutose com osmolaridade de 150 mOsmol/L), B (citrato de sódio e frutose com osmolaridade de 300 mOsmol/L) e C (água destilada) no teste hiposmótico, está demonstrado no Quadro



3. Verificou-se uma diminuição da reação de cauda dobrada entre os intervalos de tempo pós-refrigeração em todas as soluções analisadas, com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nos intervalos de 12 e 48 horas nas soluções A e B, sendo diferenças significativas observadas na solução C em todos os intervalos analisados. Ao comparar as diferentes soluções, não foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

A motilidade e o vigor dos espermatozoides são variáveis importantes no processo de transporte espermático e fertilização, devendo ser mantidas em níveis satisfatórios durante a conservação de sêmen. Resultados obtidos por Campos et al. (2003) demonstraram que o tempo de conservação afetou significativamente a motilidade individual progressiva e a percentagem de espermatozoides móveis no sêmen resfriado  $4^{\circ}\text{C}$ , diluído em diluente a base de água de coco-gema. Além disso, até as 24 horas de armazenamento, os parâmetros apresentaram-se dentro do que se preconiza para a inseminação. Estas observações coincidem com os achados neste trabalho quanto à manutenção de valores satisfatórios da motilidade individual e vigor nas primeiras 24 horas de conservação. Da mesma forma, Roca et al. (1997) também observaram redução da motilidade e aumento do número de espermatozoides com patologias, proporcionais ao tempo de armazenagem do sêmen. Estas alterações foram significativas após 48 horas de armazenamento do sêmen resfriado a  $5^{\circ}\text{C}$ , em meio diluidor a base de gema de ovo.

Os resultados encontrados no vigor espermático, coincidem com os encontrados por Andrade (2007) que observaram a diminuição do vigor nos mesmos períodos usando os diluentes de leite desnatado e tris-gema no sêmen ovino. A potencialidade do uso do sêmen refrigerado com manutenção da viabilidade em até 48 horas, representa uma alternativa no uso sistemático da inseminação artificial em caprino, pois apesar das limitações de tempo de conservação, seu uso pode ser expandido sem enfrentar as limitações inerentes ao uso do sêmen congelado, conforme foi constatado por Menchaca et al. (2005) que obtiveram bons resultados de inseminação com sêmen refrigerado por 12 horas à  $5^{\circ}\text{C}$  e Milczewski et al. (2000) com manutenção por 8 horas.

A integridade da membrana plasmática pela sua importância na biologia espermática tem sido alvo de estudo enfocando sua integridade no uso de diluentes e protocolos de conservação de sêmen refrigerado e congelado. Jeyendran et al. (1984) ao descreverem a utilização da técnica para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozóide humano, testaram soluções com osmolaridades que variaram de 50 a 300 mOsmol/L, obtendo os melhores índices de reação espermática ao teste ao utilizarem as soluções a 150 mOsmol/L. Estas observações assemelham-se as obtidas no presente trabalho, apesar de também ter sido observado bons resultados com a solução hiposmótica com osmolaridade de 300 mOsmol/L. Os mesmos autores também testaram diferentes solutos (citrato de sódio, sucrose, melitose, frutose e cloreto de sódio) e associações entre eles, e verificaram que a taxa de reação espermática variava de acordo com a solução usada, dentro da mesma faixa de osmolaridade. Obtiveram os melhores resultados com a utilização da associação entre citrato de sódio (50%) e frutose (50%) a 150 mOsmol/L, incubada por 30 minutos a 37°C. O uso da solução de citrato de sódio e frutose no presente trabalho teve como apoio os resultados encontrados por estes autores.

O referido teste hiposmótico apresenta como princípio a observação de que um espermatozóide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares (Santos et al. 2001). Este teste apresentou uma boa resposta da avaliação da integridade da membrana plasmática das células espermáticas, conforme foi relatado por Hoffmann (2003) e Busch & Wabersky (2007).

O uso da conservação do sêmen a 5°C tem sido amplamente utilizada com resultados satisfatórios (Maxwell & Watson 1996). O interesse neste trabalho foi associá-lo com a reação do teste hiposmótico das células espermáticas e o uso do diluente a base de água de coco em pó. Em caprinos, Fonseca et al. (2001), utilizando uma solução hiposmótica formulada pela combinação de citrato de sódio (50%) e frutose (50%) em água destilada, testaram osmolaridades que variavam de 50 a 300 mOsmol/L, e observaram que a maior percentagem de espermatozóides reativos ao teste e com um maior grau de reação (dobramento de cauda e edema) foi encontrada em solução hiposmótica a 125 e 150 mOsmol/L. Santos et al. (2001) também encontraram bons resultados trabalhando com essa mesma combinação de solutos, à 60 mOsmol/L.

Esses autores, porém, trabalharam com um tempo de incubação de 60 minutos à 37°C. Esse tempo é superior ao preconizado por Caiza De La Cueva et al. (1997) que citaram que o tempo ideal para que ocorram as reações é de 20 a 30 minutos. No presente trabalho foi utilizado o tempo de 30 minutos de incubação.

Em outras espécies, o teste foi utilizado de forma satisfatória na predição da fertilidade de sêmen *in vitro* e sua relação com os resultados de fertilidade a campo ou na avaliação das diferentes concentrações de osmolaridades, conforme mostraram Perez-llano et al. (2001) com sêmen de suínos e Nie & Wenzel (2005) com sêmen de garanhão. Em ovinos, Oberst et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes aos descritos neste trabalho; assim como Jeyendran et al. (1984), na espécie humana e Kumi-Diaka (1993), em cães. Já Rota et al. (2000), estudando o teste hiposmótico em bovinos não encontraram correlação com a fertilidade à campo. Isto demonstra a necessidade de serem realizados trabalhos testando resultados *in vitro* e a fertilidade à campo utilizando sêmen com diferentes diluidores na espécie bovina. Os resultados aqui encontrados encontram concordância com as observações de Andrade 2007, que testou a reação hiposmótica de sêmen ovino em diversos períodos de conservação à 5°C.

A observação de Fraser (1984) de que a correlação entre o teste hiposmótico e motilidade espermática pode aumentar, de forma significativa a previsão da capacidade de fertilização do sêmen, assume importância uma vez que o referido teste hiposmótico é de fácil execução e pode ser utilizado de forma rotineira na avaliação de outros diluentes usando sêmen refrigerado de caprinos.

Diante do exposto, conclui-se que a motilidade individual progressiva e o vigor do sêmen caprino refrigerado, diluído em água de coco em pó, foram mantidas em padrões aceitáveis para a utilização na inseminação artificial nas primeiras 24 horas, e que as soluções hiposmóticas a base de citrato de sódio e frutose com osmolaridades de 150 e 300 mOsmol/L e a água destilada, não apresentam diferenças na avaliação da integridade da membrana de espermatozoides caprino refrigerado, diluído em água de coco em pó.

**Quadro 1. Motilidade individual progressiva dos espermatozóides de bodes Moxotó diluídos em água de coco em pó em diferentes períodos pós-resfriamento, Patos-PB, 2010**

Horários	N	Médias $\pm$ Desvios Padrão
Fresco (0 hora)	12	80 $\pm$ 5,97a
12 horas	12	61,87 $\pm$ 18,88b
24 horas	12	47,50 $\pm$ 26,72b
48 horas	12	28,12 $\pm$ 23,89c

F/12=P<0,05, F/24=P<0,001, F/48=P<0,001, 12/24=P<0,05, 12/48=P<0,05, 24/48=0,05

**Quadro 2. Vigor dos espermatozóides de bodes Moxotó diluídos em água de coco em pó em diferentes períodos pós-resfriamento, Patos-PB, 2010**

Horários	N	Médias $\pm$ Desvios Padrão
Fresco (0 hora)	12	3,0 $\pm$ 0,92a
12 horas	12	2,12 $\pm$ 0,83ac
24 horas	12	1,87 $\pm$ 0,99ac
48 horas	12	1,37 $\pm$ 0,74bc

Médias com letras diferentes variam significativamente a nível de P<0,05.

**Quadro 3. Percentual de espermatozóides reativos ao teste HOST no sêmen de bodes Moxotó diluído em água de coco em pó e refrigerado à 5°C quando submetidos a três diferentes soluções hiposmóticas, Patos-PB, 2010**

Horário	N	Solução A (Citrato de Sódio e Frutose / 150 mOsmol/L)	Solução B (Citrato de Sódio e Frutose / 300 mOsmol/L)	Solução C (Água Destilada)
12 horas	12	57 ± 11,04aA	55,50 ± 12,64aA	63,83 ± 7,46aA
24 horas	12	52,16 ± 6,67aAB	52,16 ± 10,36aAB	58,66 ± 5,42aB
48 horas	12	41,4 ± 3,91aB	40,20 ± 4,72aB	43,40 ± 4,98aC

Letras minúsculas iguais na mesma linha não mostram diferença significativa a 5%

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não mostram diferença significativa a 5%

### REFERÊNCIAS

- Alves S.G.G., Snoeck P.P., Ribeiro Filho A. de L., Bittencourt R.F., Portela A.P.M., Melo M.I.V. & Henry M. 2004. Effects of solution, incubation IME and sperm fixation on equine cryopreserved sperm cells submitted to the hypoosmotic swelling test. International Congree on Animal Reproduction, Porto Seguro, BA, 508p.
- Andrade, A. K. G de. 2007. Utilização do teste hiposmótico na avaliação de sêmen ovino refrigerado com diluentes a base de tris-gema e leite desnatado. Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária, UFCG, Patos - PB, 32 p.
- Amann R.P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample predicted accurately? J. Androl. 10:89-98.
- Busch W. & Wabersky D. 2007. Künstliche besamung bei haus-und nutztieren. Schattauer, Stuttgart. 320p.
- Caiza De La Cueva F.I., Rigau T. & Bonet S. 1997. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effect of ouabain. Theriogenology 47:765-784.

- Campos A.C.N., Nunes J.F. & Monteiro A.W.U. 2003. Conservação do sêmen caprino a 4°C durante o período seco e chuvoso no Nordeste do Brasil. *Ver. Bras. Reprod. Anim.* 27:620-624.
- Fonseca J.F., Torres C.A.A., Rovay H. Borges A.M., Barbosa L.P., Maffili V.V. & Fraga D.B.M. 2001. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 25:436-457.
- Fraser L.R. 1984. Mouse sperm capacitation “in vitro” involves loss of a surface associated inhibitory component. *J. Reprod. Fert.* 72:373-384.
- Hoffmann B. 2003. *Andrologie – physiologie, pathologie und biotechnologie der männlichen fortpflanzung.* Lehmanns media, Berlin. 122p.
- Jeyendran R.S., Vander Vem H.H., Perez-Pelaez M., Crabo, B. & Zaneveld, L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other sêmen characteristics. *Journal Reproduction Fertility* 70: 219-228.
- Kumi-Diaka J. 1993. Subjecting canine sêmen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39:1279-1289.
- Maxwell W.M.C. & Watson P.F. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42:55-65.
- Melo M.I.V. 1999. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. Tese de Doutorado em Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 67p.
- Menchaca A.A., Pinczak D. & Queirolo C. 2005. Storage of ram sêmen at 5°C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rates in ewes. *Anim. Reprod.* 2:195-198.
- Milczewski V., Kozicki L.E., Luz S.L.N., Neves J.P. 2000. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. *Archives of Veterinary Science* 5:35-39.

- Nie G.J. & Wenzel G. 2005. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoa plasma membranes. *Anim. Reprod.* 2:195-198.
- Nunes J.F., Combarrous Y. 1995. Utilização da água de côco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. *Anais do Simpósio de Biotecnologia da Reprodução de Animais Domésticos, Fortaleza, CE.* 53-64p.
- Oberst E.R., Jobim M.I.M & Mattos R.C. 2003. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos para avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 27:375-376.
- Pérez-llano B., Lorenzo J.L., Yenes A., Trejo P. & Garcia-Casado C. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56:387-398.
- Roca J., Carrizosa J.A. & Campos I. 1997. Viability and fertility of um washed Murciano-Granadiana goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Rum. Res.* 25:147-153.
- Rota A., Penzo N. & Vincenti L. 2000. Hypoosmotic swelling (HOS) as a acreeing assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 53:1415-1420.
- Santos A.D.F., Torres C.A.A., Fonseca J.F., Borges A.M., Rovay H., Goretti R.G, Guimaraes J.D., Costa E.P., Barbosa L.P., Maffili V.V. & Fraga D.B.M. 2001. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelibilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 25:438-439
- Traldi A.S. 2006. *Biotécnicas Aplicadas a Reprodução de Pequenos Ruminantes.* FEINCO – Feira Internacional de Caprinos e Ovinos.

## CAPÍTULO II

Utilização de diversas soluções hiposmóticas na avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e em leite em pó desnatado

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, de acordo com o que estabelece as Normas de 11 de Julho de 2008, do Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos - PB.



**Utilização de diversas soluções hiposmóticas na avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e em leite em pó desnatado<sup>1</sup>**

Allan K. B. Silva<sup>2\*</sup>, Carlos E. P. Alfaro<sup>2</sup>, Aline G. Mamede<sup>2</sup>, Marquiliano F. de Moura<sup>2</sup>, Anny Kaline de A. Gomes<sup>2</sup>, José F. Nunes<sup>3</sup>, Cristiane C. de M. Salgueiro<sup>3</sup>, Vera L. de L. Torres<sup>2</sup>.

ABSTRACT – Silva A.K.B., Peña-Alfaro C.E., Mamede A.G., Moura M.F., Gomes A.K. de A., Nunes J.F., Salgueiro C.C. de M. & Torres V.L.L. 2009. [**Use of various solutions hypoosmotic in the evaluation of semen sheep refrigerated diluted in coconut water powder and in skimmed milk powder.**] Utilização de diversas soluções hiposmóticas na avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e leite em pó desnatado. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Hospital de Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, 58700-970 Patos, PB, Brazil. E-mail: allankariston@yahoo.com.br

The present work had as objective to study the efficiency of different hypoosmotic solutions in the assessing the goat semen of three reproducers of the Saint Inês breed, diluted in coconut water powder and skimmed milk powder and refrigerated at 5°C. The hypoosmotic solutions were based on sodium citrate and fructose, with osmolarities of 150 mOsmol/L and 300 mOsmol/L. Ten harvests were carried out on each reproducer, being the semen evaluated against macroscopic and microscopic characteristics and submitted to the hypoosmotic test after 12, 24 and 48 hours post-refrigeration. The results found that the individual progressive motility and vigor after dilution using the two diluents, were maintained in satisfactory levels in the first 24 h after refrigeration. The hypoosmotic test has not showed difference when performed with hypoosmotic solution 150 and 300 mOsmol/L in the evaluation of plasma membrane of sheep sperm in different periods.

INDEX TERMS: sperm, sheep, hiposmotic test, chilled semen

---

<sup>1</sup> Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup> Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, 58700-970, Patos, PB, Brasil. \*Autor para correspondência: [allankariston@yahoo.com.br](mailto:allankariston@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> PPGCV - Universidade Estadual do Ceará

**RESUMO** - O presente trabalho teve como objetivo estudar a eficiência de diferentes soluções hiposmóticas na avaliação do sêmen de três carneiros da raça Santa Inês, diluídos em água de coco em pó e em leite em pó desnatado e refrigerado à 5°C. As soluções hiposmóticas foram à base de citrato de sódio e frutose, com osmolaridades de 150 mOsmol/L e 300 mOsmol/L. Foram realizadas dez colheitas por reprodutor, sendo o sêmen avaliado quanto as características macroscópicas e microscópicas e submetido ao teste hiposmótico nos períodos de 12, 24 e 48 horas pós-refrigeração. Nos resultados verificou-se que a motilidade individual progressiva e o vigor após a diluição utilizando os dois diluentes, manteve-se satisfatórias nas primeiras 24 h após a refrigeração. O teste hiposmótico não mostrou diferença quando realizado com solução hiposmótica de concentração 150 e 300 mOsmol/L na avaliação da membrana plasmática dos espermatozóides ovino nos diferentes períodos.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** espermatozóide, ovinos, teste hiposmótico, sêmen refrigerado.

## INTRODUÇÃO

A ovinocultura desempenha importante papel sócio-econômico na região Nordeste do Brasil, principalmente na região semi-árida, onde tradicionalmente os sistemas de produção dos pequenos ruminantes têm se caracterizado por apresentar baixos índices de produção, em decorrência das práticas de manejo inadequadas, condição sanitária e alimentar deficientes, baixa capacidade de investimento dos produtores, assistência técnica pouco acessível aos pequenos produtores, pouca disponibilidade de alimentos nas épocas secas, assim como pouco uso de tecnologias massificadas que contribuem para a melhoria dos índices produtivos e reprodutivos, entre outras (Andrade 2007).

A adoção de técnicas de manejo nutricional e sanitário adequados, aliados à utilização de tecnologias reprodutivas, a exemplo da inseminação artificial, representa uma importante ferramenta na melhoria do potencial produtivo dos rebanhos ovinos, principalmente com a utilização de raças especializadas para a produção de carne e peles (Nunes 1998, Peña-Alfaro, 2006).

No processo de tecnologia do sêmen refrigerado ou congelado, a avaliação dos efeitos da manipulação sobre a qualidade espermática, principalmente a agressão sobre integridade da membrana plasmática, assume papel importante na identificação de fatores que limitam os índices de fertilidade. Em decorrência disso, torna-se necessário avaliar de forma simples e segura a integridade da membrana plasmática (Andrade 2007).

Os diluentes de sêmen destinam-se a prolongar a vida fértil do espermatozóide e a protegê-lo de condições ambientais desfavoráveis (Pickett & Amann 1987; Brinsko & Varner 1992). Vários pesquisadores têm demonstrado o uso satisfatório de diluentes à base de água de coco na fertilidade de sêmen de caprinos e ovinos (Nunes, 1987; Freitas, 1998; Nunes & Salgueiro, 1999). Esses efeitos podem ser devidos à rica composição em açúcares, aminoácidos, proteínas, presentes na água de coco. No entanto, alguns fatores limitam o uso da água de coco *in natura*, em primeiro lugar, à inexistência de padronização, diferenças de variedades, tipos de cultivo, idade, sanidade e fatores ambientais, que influenciam substancialmente sua complexa composição (Nunes & Salgueiro, 2006).

A padronização e estabilização da água de coco na forma de pó foram realizadas por Nunes & Salgueiro (2006), visando a sua utilização em processos biotecnológicos reprodutivos. O produto (ACP-102<sup>®</sup>) tem apresentado a manutenção das características físicoquímicas do produto, o que garante a simplificação de sua utilização, podendo representar uma alternativa para a difusão de várias biotécnicas.

Outro diluente amplamente utilizado para preservação de sêmen é a base de leite desnatado (Voss & Pickett 1976). O leite é um líquido orgânico com importante propriedade biológica para a conservação dos espermatozoides por possuir certa função tampão, ação bactericida, viscosidade adequada para manutenção dos espermatozoides no meio líquido, e abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozoides na produção de energia. Sabe-se que duas substâncias responsáveis por esta característica são: a lactose, que age como elemento energético, e a caseína que é uma substância capaz de potencializar a atividade cinética dos espermatozoides (Cunha 2002).

Na tentativa de melhorar a preservação de sêmen ovino durante o resfriamento, diversos diluidores têm sido testados, e alguns testes laboratoriais, como o teste hiposmótico, tem sido indicado para prever a fertilidade do sêmen processado em meios de conservação, uma vez que o mesmo indica o grau de integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (Andrade 2007).

A habilidade do teste hiposmótico em avaliar a integridade funcional da membrana plasmática torna-o um teste complementar importante na avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado, uma vez que tanto a congelamento quanto o resfriamento podem levar a efeitos deletérios sobre a membrana (Melo et al. 2005).

Este teste foi originalmente elaborado para avaliar a atividade bioquímica da membrana plasmática intacta em espermatozoides humanos (Jeyendran et al. 1984), mas atualmente tem sido utilizado como protocolo de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de diversas espécies: eqüinos (Alves et al. 2004; Melo 1999), caninos (Kumi-Diaka 1993), ovinos (Oberst et al. 2003) e caprinos (Fonseca et al. 2001; Santos et al. 2001; Salgueiro et al. 2002, Andrade 2007).

Apesar de ser um teste relativamente novo para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide, o teste hiposmótico deve ser considerado como um indicador de fertilidade, já que a viabilidade da membrana é um requisito básico para que ocorra a fertilização. Além disso, este teste tem sido apontado como método prático para prever a fertilidade dos reprodutores e avaliar a eficiência de protocolos de tecnologia de sêmen, por possibilitar uma análise das lesões da membrana plasmática (Melo 1999).

Desta forma, objetivou-se com este trabalho comparar duas soluções hiposmóticas para realizar o teste hiposmótico, na avaliação da integridade da membrana espermática do sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e em leite pó desnatado, mantido por diferentes períodos, avaliando também as características de motilidade individual progressiva e vigor.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de

Campina Grande, Campus de Patos – PB. Foram utilizados três reprodutores da raça Santa Inês com idade variando de 18 a 24 meses e de fertilidade comprovada. Os animais foram vermifugados e mantidos em baias coletivas, recebendo alimentação a base de capim elefante (*Pennisetum purpureum*), suplementação balanceada com farelo de soja, farelo de milho, farelo de caroço de algodão, farelo de trigo, milho triturado, uréia, calcário calcítico, fosfato bicálcico, mistura vitamínico-mineral, sal iodado e água *ad libitum*.

Foram realizadas dez colheitas de sêmen em cada reprodutor por meio de eletroejaculação, em seguida, o ejaculado foi mantido em banho-maria à 37°C, onde foram avaliadas as características macroscópicas (volume, cor e aspecto) e microscópicas (motilidade individual progressiva, vigor, concentração espermática e morfologia), segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). A motilidade individual progressiva foi estimada em microscópio óptico com objetiva de 10x, em forma percentual de 0 a 100% e ao vigor foram atribuídos valores de 1 a 5. A morfologia espermática foi avaliada em preparação úmida usando uma gota de sêmen em lâmina sob lamínula, em microscopia de contraste de fase, com objetiva de imersão, contando 200 células e a concentração espermática realizada em câmara de Neubauer, com amostra de sêmen diluída a uma proporção de 1:400 em solução de formol citrato. Utilizou-se ejaculados com volume de acima de 0,5 mL, motilidade individual progressiva maior ou igual a 75%, vigor maior ou igual a 3 e patologia espermática menor que 10%.

Após a avaliação do sêmen, os ejaculados foram fracionados em partes iguais para uso dos diluidores padronizado à base de água de coco em pó (ACP-102<sup>®</sup>) e leite em pó desnatado, utilizou-se 10 g de leite em pó desnatado e 0,057 g de glicose, diluído em 100 ml de água destilada. A diluição foi realizada na proporção de 1:9 (sêmen e diluente respectivamente). Após a diluição, o sêmen foi colocado na geladeira à 5°C, e avaliado quanto as característica de motilidade, vigor e realizado o teste hiposmótico às 12, 24 e 48 horas pós diluição.

Para realização do teste hiposmótico foram colhidas alíquotas de 20µL de sêmen diluído e colocado em tubos ependorf contendo cada um 1 mL de cada solução hiposmótica que foram incubados a 37°C em banho-maria por 30 min. (Melo 1999;

Hoffmann 2003). Foram utilizadas duas soluções: Solução 1 - citrato de sódio e frutose diluído em 100 ml de água destilada, com osmolaridade de 150mOsmol/L; e Solução 2 - citrato de sódio e frutose diluído em 100 ml de água destilada, com osmolaridade de 300mOsmol/L, conforme proposto por Hoffmann (2003).

As avaliações morfológicas das amostras foram realizadas através da colocação de alíquotas dessa mistura entre lâmina e lamínula, para contagem de 200 células em microscopia de contraste de fase com objetiva de imersão.

As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada, segundo descrito por Kumi-Diaka (1993),

O cálculo do número de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (HOST) foi realizado por intermédio da fórmula citada por Melo (1999),  $HOST\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste hiposmótico}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste hiposmótico})$ . Nesta fórmula de cálculo todas as alterações de cauda, associadas ou não a defeitos de outra região de espermatozóide, serão computadas antes e depois do teste hiposmótico.

Para análise dos dados foi utilizado o programa InStat 3 para as três variáveis de estudo. A motilidade individual progressiva e a reação ao teste hiposmótico foram analisadas através de análise de variância e as diferenças comparadas pelo teste de Student o vigor foi analisado pelo teste não paramétrico de Friedman, considerando uma probabilidade de 5%.

## **RESULTADOS**

O Quadro 1 mostra a motilidade individual progressiva dos espermatozóides diluídos em água de coco em pó e em leite em pó desnatado de carneiros da raça Santa Inês. Verificou-se que o sêmen diluído em água de coco em pó mostrou diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre o momento 0 h ( $90 \pm 6,58$ ), imediatamente após a colheita, ainda sem nenhuma diluição e com 48 h ( $67.5b \pm 9,48$ ) de conservação à 5° C, não havendo sido verificadas diferenças entre os outros horários. No sêmen diluído em leite em pó desnatado também verificou-se da mesma forma, diferença entre os momentos 0 h ( $90 \pm 6,58$ ) e 48 h ( $45 \pm 6,25$ ) e ainda entre os momentos 24 h ( $70 \pm 6,24$ ) e 48 h

(45±6,25). Ao comparar os diluentes nos diversos horários verificou-se que não houve diferença estatística ( $P<0,01$ ) entre os mesmos.

Os resultados da avaliação do vigor espermático apresentados no Quadro 2, mostram que houve diferença significativa ( $P<0,01$ ) nos intervalos nos momentos 0 h (4±0,66) - 24 h (2,85±0,50) e 0 h (4±0,66) - 48 h (2,2±0,66) após diluição e refrigeração à 5 °C com diluente a base de água de coco em pó, e também nos períodos entre 12 h (3,45±0,49) e 48 h (2,2±0,66) com o mesmo diluente. Observou-se que o sêmen diluído em leite em pó desnatado comportou-se de forma semelhante ao diluente de água de coco em pó, já quando se comparou os diluentes entre os horários, observou-se que não houve diferença ( $P<0,01$ ) entre ambos, em todos os horários.

No Quadro 3 estão presentes as reações ao teste hiposmótico dos espermatozoides de carneiros em diferentes momentos pós-diluição para os diluentes utilizados. Em relação ao teste hiposmótico, observou-se ao comparar os horários de avaliação do sêmen diluído em água de coco em pó e uso de solução hiposmótica 1 (150 mOsmol/L), que não houve diferença ( $P<0,01$ ) entre os horários 12 e 24 h, no entanto foi observada diferença significativa no intervalo de 12 e 48 h, o mesmo comportamento foi observado no mesmo diluente com solução hiposmótica 2 (300 mOsmol/L), porém quando observados os resultados do teste hiposmótico no sêmen diluído no leite em pó desnatado, não observou-se diferença significativa ( $P<0,01$ ) nos diferentes períodos com o uso da solução hiposmótica 1 e 2. A comparação dos diluentes com o uso das duas soluções hiposmóticas não apresentaram variações significativas ( $P<0,01$ ) em todos os horários avaliados.

## DISCUSSÃO

A avaliação seminal pós-diluição assume importância na caracterização da qualidade espermática visando bons índices de fertilidade no uso da inseminação artificial com sêmen fresco, refrigerado ou congelado. Neste sentido a mensuração das variações nos parâmetros motilidade e vigor são relevantes, conforme ressaltam Weitzel (2001), o qual considera que a motilidade individual progressiva e o vigor dos espermatozoides são importantes parâmetros na avaliação da potencialidade da fertilidade, já que em condições normais somente os espermatozoides com movimento retilíneo e vigoroso batimento de cauda conseguem ultrapassar a cérvix e a junção

útero-tubarica e atingir o local da fecundação no oviduto e penetrar as diversas camadas do *cumulus oophorus* e da zona pelúcida. O autor considerou ainda que é fundamental a análise destes parâmetros nos trabalhos de comparação de diluente, tempo de equilíbrio, e outros procedimentos que representem as características metabólicas das células, seja *in vitro* ou envolvendo teste de fertilidade à campo.

Na análise da motilidade individual progressiva no presente estudo, verificou-se que no diluente a base de água de coco em pó houve diferença entre os momentos 0 h e 48 h, ressaltando que o mesmo pode ser utilizado de forma satisfatória até as primeiras 24 h, no entanto, o valor de motilidade individual progressiva obtido nas 48 h encontra-se dentro dos parâmetros de viabilidade espermática ao considerar que 67.5% de motilidade individual progressiva ainda oferece a possibilidade de promover uma fecundação, uma vez que os espermatozoides no processo de resfriamento não sofrem as injúrias verificadas com o sêmen congelado. Coincidindo com as observações de Silva (1993) que considera a motilidade individual progressiva com valores acima de 50% para o sêmen refrigerado oferece resultados satisfatórios de fertilidade, uma vez que a população espermática é maior que aquela utilizada no sêmen congelado e as células não sofreram o impacto do processo de congelação e descongelação, conforme Traldi (2006) que sugeriu maior dano das células nesses processos da criopreservação espermática.

A observação de diferenças na motilidade progressiva entre as 0 h e 48h e entre as 24 h e 48 h no uso do diluente a base de leite em pó direciona-se no sentido de uma comparação semelhante ao outro diluente, no entanto o valor obtido 48 h após a diluição mostra valores inferiores ao de água de coco em pó, fato este que pode trazer uma influência direta nos índices de fertilidade. Por outro lado a comparação entre os dois diluentes nos diversos horários observados não sugerem diferenças entre ambos, mas que associado ao desempenho na comparação entre os horários no diluente sugere-se um melhor desempenho da motilidade do diluente a base de água de coco em pó ao comparar com o diluente de leite em pó desnatado (Betini et al. 1998). Em ovinos, o uso satisfatório do diluente a base de leite desnatado foi constatado por Andrade (2007) que obteve melhores resultados com o uso desse diluente ao se comparar com o Tris-Gema. Os dados do presente trabalho sugerem resultados melhores no uso do diluente à base de água de coco em pó.



Com relação ao vigor espermático observou-se nos dois diluentes, uma redução percentual após as primeiras 12 h, o que leva a supor que apesar da motilidade individual progressiva estar presente, a força do movimento não acompanhava essa motilidade das células, evidenciando uma diminuição do processo metabólico celular, no entanto essa redução se mantém dentro de valores considerados satisfatórios para a qualidade espermática que possibilite tanto o transporte espermático normal quanto a fertilização.

A avaliação da integridade da membrana plasmática das células espermáticas, possibilita prever a qualidade do sêmen quanto a sua fertilidade (Fonseca et al. 2001, Melo et al. 2005). O referido teste apresenta como princípio a observação de que um espermatozóide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares (Santos et al. 2001). Este teste apresentou uma boa resposta da avaliação da integridade da membrana plasmática das células espermáticas, conforme foi relatado por Hofmann (2003) e Busch & Waberski (2007).

A observação que à medida que aumenta o tempo de conservação não aumentou o percentual de células que reagem ao teste hiposmótico, leva a relacionar a manutenção da integridade da membrana plasmática com sua conservação no sêmen refrigerado à 5°C nos períodos de 12, 24 e 48 horas pós-diluição e refrigeração, em ambos diluentes. Isto assume importância já que fica evidente que a diminuição da fertilidade observada no uso de sêmen conservado em diferentes períodos, relaciona-se com a diminuição da motilidade, do vigor e com os danos que a membrana plasmática podem sofrer nessa conservação. Estes resultados estão em sintonia com as observações de Andrade 2007, que verificaram o mesmo comportamento usando os diluentes a base de tris-gema e leite desnatado em ovinos.

Nos trabalhos iniciais desenvolvidos por Jeyendran et al. (1984), foram testadas soluções com osmolaridades que variaram de 50 a 300 mOsmol, obtendo os melhores índices de reação espermática ao teste ao utilizarem soluções a 150 mOsmol/L, também observado por Melo & Henry (2005) quando estudaram o teste hiposmótico na espécie equina e Fonseca et al. (2001) na espécie caprina. No presente trabalho ao

comparar-se cada um dos momentos de avaliação nos dois diluentes em relação às soluções com 150 e 300 mOsmol/L não foram observadas diferenças, coincidindo com as observações de Oberst (1993) que estudando sêmen ovino não verificou variações testando diversas soluções com osmolaridade variando entre 100 e 150 mOsmol/L. Com relação ao tempo de incubação do sêmen, a maioria dos trabalhos relataram um período de 30 minutos, no entanto Alves et al. (2004) reportaram que 15 minutos foram suficientes para expressar as reações morfológicas do teste hiposmótico. No presente trabalho o sêmen foi incubado por um período de 30 minutos segundo as observações de Andrade (2007).

Diante dos resultados apresentados conclui-se que, o sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e em leite em pó desnatado mantém suas características de motilidade individual progressiva e vigor satisfatórios nas primeiras 24 horas pós-resfriamento e que as soluções hiposmóticas a base de citrato de sódio e frutose com osmolaridades de 150 e 300 mOsmol/L, não apresentam diferenças na avaliação das alterações da membrana plasmática das células espermáticas ovina, sugerindo o uso das mesmas na avaliação desse importante parâmetro.

**Quadro 1. Motilidade individual progressiva dos espermatozóides de carneiros Santa Inês diluídos em água de coco em pó e em leite em pó desnatado em diferentes períodos pós-resfriamento. Patos-PB, 2010**

Diluentes	Horários			
	0 h	12 h	24 h	48 h
Água de coco em pó	90±6,58aA	82.5±6,78abA	75±7,71 abA	67.5b±9,48 bA
Leite em pó desnatado	90± 6,58 acA	80±7,76cdA	70±6,24 adfA	45±6,25 bA

Letras iguais minúsculas na mesma linha não mostram diferença significativa (P<0.01)

Letras iguais maiúsculas na mesma coluna não mostram diferença significativa (P<0.01)

**Quadro 2. Vigor dos espermatozóides de carneiros Santa Inês diluídos em água de coco em pó e em leite em pó desnatado em diferentes períodos pós-resfriamento. Patos-PB, 2010**

Diluentes	Horários			
	0 h	12 h	24 h	48 h
Água de coco em pó	4±0,66aA	3,45±0,49abA	2,85±0,50bcA	2.2±0,66cA
Leite em pó desnatado	4±0,66aA	3,3±0,48abA	2.65±0,52bcA	1,55±0,64cA

Letras iguais minúsculas na mesma linha não mostram diferença significativa (P<0.01)

Letras iguais maiúsculas na mesma coluna não mostram diferença significativa ( $P < 0.01$ )

**Quadro 3. Percentual de espermatozóides reativos ao teste HOST no sêmen de carneiros Santa Inês diluído em água de coco em pó e em leite em pó desnatado e refrigerado à 5°C quando submetidos a duas soluções hiposmóticas, Patos-PB, 2010**

Diluentes	Sol.hiposmótica	Horários		
		12 h	24 h	48 h
Água de coco em pó	150 mOsmol/L	66±9,95 aA	60,08±9,30aA	55,8±7,32bA
	300mOsmol/L	62,2±7,26aA	57,35±7,79abA	49,77±6,11bA
Leite em pó desnatado	150 mOsmol/L	69,14±4,57aA	59,87±7,54aA	53,40±10,08aA
	300mOsmol/L	61,05±5,90aA	55,75±7,72aA	51,65±9,88aA

Letras minúsculas iguais na mesma linha não mostram diferença significativa ( $P < 0,01$ )

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não mostram diferença significativa ( $P < 0,01$ )

## REFERÊNCIAS

- Alves S.G.G., Snoeck P.P.N. & Ribeiro filho A.L. 2004. Effects of solution, incubation time and sperm fixation on equine cryopreserved sperm cells submited to the hypoosmotic swelling test. Anais International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, BA, p.508.
- Andrade A.K.G. 2007. Utilização do teste hiposmótico na avaliação de sêmen ovino refrigerado com diluentes à base de tris-gema e leite desnatado. Monografia de conclusão do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 32p.
- Betini C.M., Moraes G.V. & Rigolon L.P. 1998. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. Acta Sci. 20:361-365.
- Brinsko S.P. & Varner D.D. 1992. Artificial insemination and preservation of semen. Vet Clin North America: Equine Practice. 8:205-218.
- Busch W. & Wabersky D. 2007. Künstliche besamung bei haus-und nutztieren. Schattauer, Stuttgart. 320p.
- Cunha I.C.N. 2002. Criopreservação do sêmen de cães. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 149p.
- Fonseca J.F., Torres, C.A.A., Rovay H., Borges A.M., Barbosa L.P., Maffili V.V., Fraga D.B.M. 2001. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. Rev. Bras. de Rep. Anim. 25:436-457.

- Freitas, V. J. F. 1998. Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina coriônica (eCG) inseminadas artificialmente. Monografia de Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.
- Jeyendran R.S., Vander Vem H.H., Perez-Pelaez M., Crabo, B., Zaneveld, L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70: 219-228.
- Hoffmann B. 2003. *Andrologie – Physiologie, Pathologie und biotechnologie der männlichen fortpflanzung*. Berlin, Lehmanns. 122p.
- Kumi-Diaka J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*. 39:1279-1289.
- Melo M.I.V. 1999. Teste Hiposmótico na avaliação do sêmen equino. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 67p.
- Melo M.I.V., Henry M. & Beker A.R.C.L. 2005. Teste hiposmótico para avaliação do sêmen equino resfriado com diferentes diluentes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57:157-763.
- Nunes J. F. 1987. Coconut water as diluent for goat semen. IV Conferência Internacioanal Sobre Caprinos, *Anais...* Brasília, DF.
- Nunes J.F. 1998. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina. *Anais I Congresso Nordestino de Produção Animal*, Fortaleza, CE.
- Nunes, J. F. & Salgueiro, C. C. de M. 1999. Utilização da água de coco como diluente do sêmen de caprinos e ovinos. *Rev. Cient. Prod. Anim.* v.1:17-46.
- Nunes J.F. & Salgueiro C.C. de M. 2006. Biotecnias da Reprodução Animal – Caprinos e Ovinos. *Anais Eletrônicos 58<sup>o</sup> Reunião Anual da SBPC*, Florianópolis, SC, Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/58ra>.

- Oberst E.R., Jobim M.I.M & Mattos R.C. 2003. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos para avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. *Recista Brasileira de Reprodução Animal*. 27:375-376.
- Peña-Alfaro, C. E. 2006. Apontamentos Curso de Reprodução de pequenos ruminantes, Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária de Ruminantes e Equídeos, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 25 p.
- Picket B.W. & Amann R.P. 1987. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Journal Equine Veterinary Science*. 7:289-302.
- Salgueiro C.C., Nunes J.F. & Oliveira K.L. 2002. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó na inseminação programada de cabras. *Rev. Bras. Repro. Anim.* 5:96-98.
- Santos A.D.F., Torres C.A.A., Fonseca J.F., Borges A.M., Rovay H., Goretti R.G., Guimarães J.D., Barbosa L.P., Maffili V.V. & Fraga D.B.M. 2001. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 25:438-439.
- Silva M.A.V. 1993. Efeito de diferentes diluentes de congelamento e de duas temperaturas de descongelamento sobre a integridade acrossômica, vigor e motilidade espermática do sêmen caprino. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. 89p.
- Traldi A.S. 2006. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP. Pirassununga, SP.
- Voss J.L. & Pickett B.W. 1976. Reproductive management of the broodmare. *Colorado State University Exp. Stat. Anim. Reprod. Lab.* 22p.
- Weitze K.F. 2001. Spermatologische Untersuchung, 561p. In: Busch & Holzmann A. *Veterinärmedizinische Andrologie*. Stuttgart, Schattauer.





## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos e o confronto bibliográfico pode-se concluir que a realização do teste hiposmótico como exame complementar na análise do sêmen refrigerado de caprinos e ovinos, diluído em água de coco em pó e leite desnatado, possibilita uma interpretação do grau de comprometimento da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. Considerando que o espermatozoide é uma célula complexa e de alta especialização, podendo torna-se incapaz para a fecundação, quando um ou mais dos aspectos bioquímicos tornam-se alterados, torna esta análise importante dada sua facilidade de execução e baixo custo, apesar da avaliação de somente um destes aspectos, não garantir a condição de normalidade dos outros, sendo o mais indicado a combinação de vários destes fatores, em análise multifatorial, para o diagnóstico com maior acurácia e confiabilidade da funcionalidade desta célula. Na comparação de diversas soluções com osmolaridades diferentes observou-se que as soluções testadas com osmolaridades de 150 e 300 apresentaram resultados semelhantes em ambas as espécies, o que leva a recomendar seus usos.

## ANEXO

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através dos e-mails <jurgen@ufrj.br> ou pvb@pvb.com.br, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

**NOTE: Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF anexo). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.**

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

**1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES** (ou combinação destes dois últimos), **Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científicas, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet- Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do **RESUMO** em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra **RESUMO**;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

## **2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:**

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br))**. O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência;**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será **incluída na lista uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

**3. As Figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

**4. As legendas explicativas das Figuras** conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

**5. Os Quadros deverão ser** explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.