

CARLOS THIAGO SILVEIRA ALVIM MENDES DE OLIVEIRA

**ADIÇÃO DE BSA AO DILUENTE BTS MODIFICADO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós - Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título
de *Magister Scientie*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

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

T	Oliveira, Carlos Thiago Silveira Alvim Mendes de, 1984-
O48a	Adição de BSA ao diluente BTS modificado na
2012	criopreservação de sêmen caprino / Carlos Thiago Silveira Alvim Mendes de Oliveira. – Viçosa, MG, 2012. xiv, 60f. : il. (algumas col.) ; 29cm.
	Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Referências bibliográficas: f. 52-60
	1. Caprino - Criopreservação. 2. Sêmen. 3. Albumina. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.
	CDD 22. ed. 636.39

CARLOS THIAGO SILVEIRA ALVIM MENDES DE OLIVEIRA

**ADIÇÃO DE BSA AO DILUENTE BTS MODIFICADO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

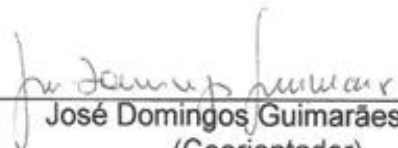
APROVADA: 14 de fevereiro de 2012.



Laércio dos Anjos Benjamin



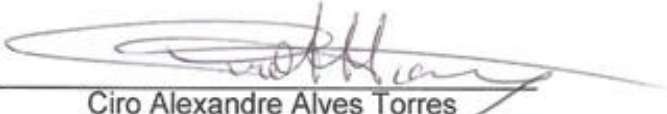
Cláudio José Borela Espescht



José Domingos Guimarães
(Coorientador)



Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Coorientador)



Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

Dedico esta obra a minha família: minha mãe Maria das Graças Consuelo de Oliveira, meu pai José Carlos Mendes de Oliveira, minha irmã Flávia Aline de Oliveira, e aos meus avós maternos Elvira Gonçalves da Silveira Alvim (Dinha) e Oto Fernando Alvim (Vô Totinho - “in memoriam”).

Aos meus amigos de Viçosa e Goiânia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, por estar sempre presente me iluminando e me guiando pelos caminhos dessa grande jornada, na qual somos apenas seres espirituais em busca de um significado para essa complexa passagem chamada vida.

Aos meus pais José Carlos de Oliveira e Maria das Graças de Oliveira, pelo carinho, amor e dedicação incondicionais; por nunca medirem esforços para o meu crescimento pessoal e profissional e por me ensinarem o valor da educação.

À minha irmã Flávia pelo companheirismo, amor e irmandade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado no programa de Pós-graduação, em Zootecnia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus familiares pela torcida e apoio.

Ao professor Ciro Alexandre Alves Torres, pela orientação, pela amizade e confiança.

Ao professor José Domingos Guimarães, pelo suporte material e pelo conhecimento científico para a realização deste trabalho.

Ao professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela coorientação, apoio e disponibilidade.

Ao professor Marcelo Teixeira Rodrigues, pela oportunidade concedida para realização deste trabalho no setor de caprinocultura da UFV.

Ao Dr. Cláudio Borela Espescht, pela ajuda e pelos conselhos durante o mestrado.

Ao professor Laércio dos Anjos Benjamim pela acessibilidade e por participar da banca de defesa, agregando assim conhecimento à minha dissertação.

Às secretárias da Coordenação da Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia Celeste e Fernanda, pelo auxílio e monitoramento acadêmico.

Aos estagiários pelo auxílio e dedicação.

Aos funcionários do setor de caprinocultura da UFV, pelo apoio e disposição nas atividades do capril.

Aos amigos do capril e pós graduação - Madriano, Júlio e Camila, pela contribuição fundamental, sem a qual não seria possível a realização deste experimento, tornando o ambiente de trabalho, um lugar divertido e associado ao conhecimento científico.

Aos amigos de Viçosa, Ana Paula (Aninha), David, Damares, Jurandy, Alessandra, Gisele, Vívian, Andressa, Marcos Buta, Luciana, Erly, Carol; pelos momentos agradáveis e descontraídos.

Aos amigos de Goiânia Rafael (Praga), Kelly, Raquel Leite , Rodrigo, Tiago Vilela (Titi), Rafael Amanso e Thiago Vieira; pela amizade, consideração e por torcerem pelo meu sucesso.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a minha formação e para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Carlos Thiago Silveira Alvim Mendes de Oliveira, filho de José Carlos Mendes de Oliveira e Maria das Graças Consuelo Silveira Alvim de Oliveira, nasceu em Brasília - DF em 12 de Setembro de 1984 onde residiu até seus 19 anos.

Em 2004 ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, graduando - se em janeiro de 2009.

Em março de 2010 ingressou no programa de Pós - Graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, na área de Reprodução Animal, tendo apresentado sua dissertação de Mestrado em 14 de fevereiro de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 - Estrutura da célula espermática	3
2.2 - Membrana plasmática do espermatozoide	3
2.3 - Princípios da criopreservação de sêmen.....	4
2.4 - Criopreservação de sêmen caprino	6
2.5 - Danos à membrana decorrentes da criopreservação	7
2.6 - Meios diluidores e crioprotetores.....	8
2.6.1 Crioprotetores não penetrantes	8
2.6.2. Diluentes a base de gema de ovo	9
2.6.3. Diluentes a base de leite	10
2.6.4 Crioprotetores penetrantes	10
2.6.5. Diluente Beltsville Thawing Solution (BTS)	11
2.7 Antioxidantes	12
2.8 Albumina sérica bovina.....	13
2.9. Resfriamento do sêmen.....	14
2.10. Congelamento do sêmen.....	15
2.11. Exames complementares	16
2.11.1 Teste de termorresistência	16
2.11.2. Teste hiposmótico (HOST)	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Local e período de experimentação.....	19
3.2. Animais, alimentação e sanidade.	19
3.3 Coletas de sêmen.....	20
3.4 Análises físicas do sêmen	20
3. 5 Diluição do sêmen	21
3. 6 Resfriamento do sêmen.....	22
3. 7 Congelamento do sêmen.....	22
3. 8 Delineamento experimental	22

3. 9 Diluentes.....	23
3. 10 Descongelamento e análises do sêmen	24
3. 10. 1. Teste de termorresistência	25
3. 10.2. Teste hiposmótico	25
3.11 Análises estatísticas	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Sêmen fresco	27
5. 2. Sêmen descongelado	29
6. CONCLUSÕES.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do diluente referente ao grupo bioxcell (BIOXCELL®).....	23
Tabela 2 - Composição química do diluente Beltsville Thawing Solution®-BTS.....	24
Tabela 3 – Composição dos diluentes de cada tratamento.....	24
Tabela 4 – Valores mínimos para características seminais pós-descongelamento para bodes doadores de sêmen (CBRA, 1998).....	24
Tabela 5 – Volume, aspecto dos ejaculados, coloração, concentração, turbilhonamento, motilidade e vigor do sêmen fresco caprino.....	27
Tabela 6 – Valores médios, desvios-padrão da média para motilidade e vigor no teste de termorresistência do sêmen caprino descongelado para os diferentes tratamentos experimentais e em função do tempo (minutos).....	30
Tabela 7 – Valores médios e desvios padrão do teste hiposmótico (% de células funcionais) do sêmen descongelado, entre os tratamentos.....	31
Tabela 8 – Correlações simples de Pearson para os aspectos físicos do sêmen fresco e descongelado, e também a avaliação hiposmótica do sêmen descongelado para o tratamento bioxcell.....	33
Tabela 9 – Correlações simples de Pearson dos aspectos físicos do sêmen fresco e descongelado, e também a avaliação hiposmótica do sêmen descongelado para o tratamento BTS.....	34
Tabela 10 – Correlações simples de Pearson dos aspectos físicos do sêmen fresco e descongelado, e também a avaliação hiposmótica do sêmen descongelado para o tratamento BTS + BSA 5%.....	35
Tabela 11 – Correlações simples de Pearson entre aspectos físicos do sêmen fresco e descongelado, e também a avaliação hiposmótica do sêmen descongelado para o tratamento BTS + BSA 15%.....	36

RESUMO

OLIVEIRA, Carlos Thiago Silveira Alvim Mendes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Adição de BSA ao diluente BTS modificado na criopreservação de sêmen caprino.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Coorientadores: José Domingos Guimarães e Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Este estudo tem como objetivo verificar se a albumina sérica bovina (BSA) influencia na integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides caprinos, bem como verificar o potencial uso desta proteína em meios diluentes de criopreservação de sêmen. Foram utilizados dois machos adultos da raça Alpina e dois machos adultos da raça Saanen. Para as coletas de sêmen foi utilizada vagina artificial onde se obteve cinco ejaculados por animal. Após a coleta, fez-se a avaliação das características macro e microscópicas. Em seguida, o sêmen foi diluído com os seguintes tratamentos : BIOXCELL[®] (T1), BTS (T2), BTS + BSA 5% (T3) e BTS + BSA 15% (T4). Após as diluições finais, foram avaliados a motilidade progressiva e vigor espermático de cada tratamento. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL, as palhetas foram resfriadas a cinco graus celsius, durante uma hora em refil plástico contendo álcool etílico. O pré-congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido durante 15 minutos. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio para o congelamento do sêmen. As partidas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos e homogeneizadas para a análise imediata de motilidade e vigor espermático, teste hiposmótico e teste de termorresistência. No sêmen fresco, as características físicas estavam dentro dos parâmetros normais. O volume apresentou correlação negativa com a concentração e com a motilidade progressiva ($r = - 0,38$ e $- 0,42$ respectivamente). Houve correlação positiva ($r = 0,60$) entre o turbilhonamento e a motilidade do sêmen *in natura*. As médias gerais de motilidade não diferiram entre os tratamentos, logo após o descongelamento nos tempos cinco e 30 minutos, mas diferiram ao longo do TTR ($P < 0,05$). As médias do vigor não diferiram no tempo 30 minutos, mas diferiram entre os tratamentos nos demais tempos ($P < 0,05$). O vigor do sêmen

descongelado, do grupo controle, apresentou correlação negativa com o vigor do sêmen fresco e correlação positiva com a motilidade do sêmen descongelado ($r = -0,38$ e $0,54$ respectivamente). A integridade funcional da membrana espermática, avaliada pelo teste hiposmótico, apresentou diferença entre o grupo controle e os demais tratamentos ($P < 0,05$). Houve correlação negativa ($r = -0,55$) entre o turbilhonamento e o teste hiposmótico do tratamento dois. No tratamento três houve correlação positiva entre a concentração e o hiposmótico. Conclui-se que : nenhum dos parâmetros avaliados neste estudo foi afetado pela BSA associada ao BTS modificado.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Carlos Thiago, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **BSA added to the modified BTS in cryopreservation of goat semen.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-advisers: José Domingos Guimarães and Giovanni Ribeiro de Carvalho.

The objectives of this study were to examine whether albumin serum bovine has an effect on the structural function of goat sperm plasma membrane, as well to investigate the potential use of this protein in extenders medium for cryopreservation. Two adult Alpina breed males and two adult Saanen breed males are used, totalizing five semen samples for each one. After collection, the physical characteristics of the semen were evaluated. Then the semen was diluted as follows: BIOXCELL[®] (Control - T1), BTS (T2), BTS + BSA 5% (T3) and BTS + BSA 15% (T4). After the final dilutions, the progressive motility and sperm vigor were performed for each treatment. The semen was packaged in 0.25 ml straws were cooled to five degrees for one hour in plastic container containing ethyl alcohol. The pre-freezing was done in liquid nitrogen vapor for 15 minutes. After this period, the straws were immersed in liquid nitrogen. The samples were thawed in a water bath at 37 °C for 30 seconds, packaged in micro tubes and homogenized for immediate analysis of sperm motility and vigor, hypoosmotic swelling test (HOST) and thermoresistance test. In fresh semen, the physical characteristics remained within normal parameters. The average volume correlated negatively with sperm concentration and progressive motility ($r = -0.38$ and -0.42 respectively). A positive correlation ($r = 0.60$) was found between fresh sperm motile and turbulence. The overall averages of motility did not differ among treatments, after thawing at zero and 30 minutes, but differed over the TTR ($P < 0.05$). The average vigor did not differ in time 30 minutes, but differed between treatments in other times ($P < 0.05$). The strength of the thawed, the control group, showed a negative correlation with the vigor of fresh semen and positive correlation with the motility of frozen-thawed semen ($r = -0.38$ and 0.54 respectively). The functional integrity of sperm membrane, evaluated by hypoosmotic swelling test, was different between

the control group and the other treatments ($P < 0.05$). There was negative correlation ($r = - 0.55$) between the turbulence and the HOST of treatment two. In treatment three, positive correlation found between concentration and HOST. It is concluded that: The albumin serum bovine associated with the modified did not affect any of parameters under study.

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do ANUALPEC (2010), o efetivo de caprinos foi estimado em mais de sete milhões de cabeças, sendo que 91,4% encontram-se na região Nordeste.

Novas tecnologias e procedimentos zootécnicos têm sido aplicados na caprinocultura, como, programas institucionais de extensão ou por iniciativa dos próprios pecuaristas. Contudo, poucos são os caprinocultores inseridos nessa modalidade diante do número existente, a considerar as dificuldades de investimentos, frente à disponibilidade de recursos financeiros.

As técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial e a transferência de embriões, permitem ampliar a utilização de um dado reprodutor, viabilizando sua avaliação genética por meio da progênie em espaço de tempo mais curto, aumentando assim a eficiência reprodutiva do rebanho.

O sêmen de boa qualidade é um dos principais parâmetros para o sucesso da inseminação artificial, por isso seu processamento deve preservá-lo ao máximo. Os processos de congelamento e descongelamento do sêmen até agora causam diminuição do número de espermatozoides viáveis por dose (AMANN & PICKETT, 1987; WATSON, 1995), assim, diminuindo ou controlando qualquer tipo de injúria que afete os espermatozoides, possibilitando a diminuição da concentração espermática por dose de sêmen congelado, porém muitos estudos devem ser realizados para que tais hipóteses sejam comprovadas.

A peroxidação lipídica é uma das injúrias causadas nas membranas dos espermatozoides (JONES & MANN, 1977) causada pelo estresse oxidativo devido à produção excessiva de radicais livres, os quais estão associados com o declínio da fertilidade do sêmen após o período de estocagem (MAXWELL & WATSON, 1996). O aumento de reações oxidativas possui efeito danoso na membrana espermática e no DNA dos espermatozoides. A membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados, os quais se tornam altamente sensíveis a espécies reativas de oxigênio (ROS) (COMHAIRE *et al.*, 1999; OCHSENDORF, 1999).

Desde que os primeiros espermatozoides caprinos foram congelados por SMITH & POLGE (1950), inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando estabelecer protocolos de resfriamento e congelamento do sêmen caprino. Devido a sua alta sensibilidade à peroxidação lipídica em relação ao sêmen bovino, o processo de congelamento e descongelamento aumenta essa susceptibilidade a peroxidação (BILODEAU *et al.*, 2000). Um bom diluente deve possuir baixa toxicidade à célula espermática; osmolaridade adequada, onde o espermatozoide caprino possui maior viabilidade em meios hipertônicos entre 425 e 525 mOsm; poder nutritivo e, por fim, ser de fácil preparo e baixo custo (CONCANNON & BATISTA, 1989; PURDY, 2006).

A albumina sérica bovina é uma proteína presente em grande quantidade no plasma sanguíneo da espécie bovina, a sua capacidade quelante possibilita a inativação de metabólitos tóxicos decorrentes da produção de radicais livres de oxigênio, oriundos da ativação de superóxidos pelos íons metálicos (BAVISTER, 1995).

Este estudo teve como objetivo verificar se a adição de albumina sérica bovina (BSA) ao diluente Beltsville Thawing Solution (BTS) modificado aumenta a estabilidade, a persistência e o vigor dos espermatozoides, assim como o aumento da integridade funcional da membrana plasmática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Estrutura da célula espermática

Os espermatozoides podem ser divididos de acordo com a sua morfologia em duas estruturas distintas: a cabeça e a cauda. A cabeça, cuja forma, tamanho e estrutura variam entre as espécies, contém duas regiões principais: acrossomal e a pós-acrossomal. De acordo com BARTH & OKO (1989) podem ser distinguidas cinco membranas na cabeça dos espermatozoides: a plasmalema, a membrana acrossomal externa e interna e a membrana nuclear interna e externa. A integridade e funcionalidade dessas estruturas estão fortemente relacionadas com a viabilidade da célula espermática.

2.2 - Membrana plasmática do espermatozoide

A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide, constituindo assim o componente mais externo da célula, é composta por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluído (SINGER & NICHOLSON, 1972). Sua composição, tipo de fosfolipídeos e quantidade de proteínas são variáveis e influenciam a sensibilidade ao choque térmico. Sendo os lipídeos, o principal constituinte que confere à membrana a característica de fluidez, a qual depende tanto da composição quanto da temperatura, sendo que a mudança de estado líquido para gel em membranas com maior proporção de lipídeos de cadeia insaturada ocorre em temperaturas menores (AMANN & GRAHAM, 1993). Os lipídeos de membrana são assimétricos na sua distribuição nas duas faces da bicamada, embora a assimetria, ao contrário daquela das proteínas da membrana, não seja absoluta (LEHNINGER *et al.*, 2000).

O alto conteúdo de ácidos graxos insaturados no espermatozoide tende a ocasionar estresse oxidativo (KODAMA *et al.*, 1996). Os fosfolipídeos, cujas cadeias de ácidos graxos são predominantemente poli-insaturadas, quando submetidos à redução da temperatura, assumem uma

forma cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada de forma “hexagonal II” ou micela invertida. Quando a membrana está em transição da fase fluida para a fase cristalina, para muitos lipídios, a formação dessa micela invertida é transitória; entretanto, para certos fosfolípidos, esta estrutura persiste tornando-se irreversível e impossibilitando a reorganização do arranjo bilaminar da membrana, mesmo após o reaquecimento do espermatozoide à temperatura ambiente (AMANN & PICKETT, 1987). Como consequência, tem-se aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana e, assim, causar danos irreparáveis (PARKS & GRAHAM, 1992; WATSON, 1995; BEYGI & ZARGHAMI, 2007).

2.3 - Princípios da criopreservação de sêmen

A criopreservação mantém a vida útil do sêmen por um período indeterminado à temperatura de - 196 °C em nitrogênio líquido já que, nessa temperatura as reações químicas, processos biológicos e físicos intra e extracelulares são interrompidos. Assim, as alterações espermáticas são causadas durante o processo de resfriamento, congelamento e descongelamento (PARKS & GRAHAM, 1992). O estresse inicial se dá quando o espermatozoide passa da temperatura corporal para cinco graus (SQUIRES *et al.*, 1999). Isto ocorre pela transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino, para o estado de gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS, 2002). Para minimizar este efeito é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19 °C a oito graus e pela adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente (GRAHAM, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas (- 0,5 °C/min.). Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, o espermatozoide sofre choque térmico, o fenômeno que induz a danos irreversíveis aos espermatozoides caracterizados por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade,

danos do metabolismo, da membrana plasmática e do acrossoma (GRAHAM, 1996; SQUIRES, 1999).

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, 1999). Em torno de cinco graus a água intra e extracelular permanece super resfriada e não cristaliza. Entre - 5 °C a - 10 °C começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular que permanece super resfriado, ocorre troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular ocasionando a desidratação celular. Neste ponto, a curva 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. Uma desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (MEDEIROS, 2002).

A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de se formarem grandes canais de gelo dentro da célula que causariam danos as estruturas internas e, ou, a membrana plasmática (SQUIRES, 1999).

O descongelamento vai depender de como o sêmen foi congelado. Espermatozoides congelados em curvas moderadas necessitam de curvas adequadas de descongelamento. Neste caso, como o gelo extracelular descongela lentamente, diluirá lentamente o soluto das frações de água que não congela, o que permite que a água difunda lentamente para dentro da célula, diluindo o soluto intracelular até atingir a concentração inicial. Se o espermatozoide é descongelado rapidamente, o gelo derrete, diluindo o soluto do meio e a água entrará no espermatozoide, o qual se encontra altamente concentrado, danificando o espermatozoide (GRAHAM, 1996).

2.4 - Criopreservação de sêmen caprino

A produção espermática dos caprinos sofre influência de vários fatores como raça, idade, nutrição, fotoperíodo, temperatura ambiente e umidade, que são responsáveis pela variação das características espermáticas (CHEMINEAU, 1986) e consequentemente altera a qualidade do sêmen congelado. A célula espermática sofre inúmeros fatores estressantes, que podem estar ligados ao choque térmico durante o resfriamento do sêmen, à formação de cristais intracelulares de gelo ou ao choque osmótico durante o congelamento e descongelamento, ou ainda à toxicidade devido à adição do crioprotetor (WATSON, 2000). A resposta ao processo de criopreservação varia de espécie para espécie (HOLT, 2000).

No sêmen caprino existem algumas peculiaridades em relação ao sêmen de outras espécies, sendo a mais característica a síntese e secreção no plasma seminal de enzimas com atividade fosfolipase pelas glândulas bulbo-uretrais (SIMPLÍCIO & MACHADO, 1989; LEBOEUF, 2000).

De acordo com IRITANI & NISHIKAWA (1964), essas enzimas catalisam a hidrólise de lecitinas presentes na gema de ovo em lisolecitinas, que têm ação detergente sobre lipídios de membrana, e em ácidos graxos altamente tóxicos para os espermatozoides (PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997). Sendo a lecitina também presente nas membranas plasmáticas dos espermatozoides, a composição enzimática do sêmen do bode e dos diluidores assumem grande importância no processo de conservação do sêmen congelado (SIMPLÍCIO & MACHADO, 1989).

Como possível solução desse problema, RITAR & SALAMON (1982) propuseram utilizar no diluente 1,5% de gema de ovo na sua concentração final, enquanto TULI & HOLTZ (1992) utilizaram 16,8%. No entanto EVANS & MAXWELL (1987) recomendaram 2,5% no total do volume do diluente. Diferentes graus de resistência da célula espermática ao processo de criopreservação são observados entre as espécies. Exames da ultra-estrutura espermática em microscopia eletrônica de transmissão (MET), antes e após o congelamento, mostraram que as ultraestruturas de espermatozoides bovinos eram quase idênticas antes e depois do processo. Contudo, espermatozoides de ovinos e suínos apresentaram danos

consistentes na membrana externa e no complexo acrossomal, com formação de edema de acrossoma e remoção total de regiões citoplasmáticas. Em cães houve danos ultraestruturais na cabeça e peça intermediária, afetando a estrutura básica das mitocôndrias (SILVA *et al.*, 2007). HASHIDA *et al.* (2005) concluíram que o processo de criopreservação causou danos na morfologia do espermatozoide caprino, com subsequente comprometimento da fertilidade.

2.5 - Danos à membrana decorrentes da criopreservação

O processo de criopreservação envolve uma série de respostas biofísicas, ainda não completamente compreendidas, das células e dos tecidos. A taxa de sobrevivência espermática ao resfriamento, congelamento e aquecimento dependem das taxas de resfriamento e aquecimento utilizadas, do tempo em que a célula permanece em cada etapa, do transporte de substâncias e da formação de cristais de gelo. (AMANN & PICKETT, 1987).

Durante o congelamento lento, ocorre o congelamento da água inicialmente no meio extracelular, antes que os cristais de gelo sejam formados no meio intracelular (MEDEIROS *et al.*, 2002). Com a formação de cristais de gelo no meio extracelular, a água é removida do ambiente extracelular e um gradiente osmótico é formado, levando a passagem de água para fora da célula. MAZUR P. (1977) propôs que durante o congelamento lento o dano celular era causado pelo longo período de tempo em que a célula permanecia exposta às propriedades alteradas dos meios intra e extracelulares, como resultado da formação de gelo. Este fenômeno é conhecido como efeito solução apresentando: desidratação excessiva; elevada concentração de solutos, solução tóxica à célula; e mudança de pH celular, alterando o metabolismo da célula.

Quando a célula é congelada em uma taxa de congelamento muito rápida, há a formação de gelo extracelular, levando ao aumento na concentração dos solutos extracelulares de forma muito rápida, não permitindo que a célula desidrate o suficiente, conseqüentemente ocorre

maior formação de cristais de gelo intracelular, letais para a célula. MAZUR P. (1977) postulou que a formação de cristais de gelo intracelular e o efeito solução causam danos à célula e que a taxa de congelamento ótima deveria minimizar este efeito.

2.6 - Meios diluidores e crioprotetores

O sêmen caprino é extremamente sensível ao choque térmico, às variações de pH e pressão osmótica da solução diluente (DEKA & RAO, 1985). Para que o espermatozoide ejaculado sobreviva a longos períodos, é necessária a adição de agentes protetores no sêmen que proporcionem nutrientes como fonte de energia, o tamponamento do pH, a pressão osmótica adequada, o equilíbrio eletrolítico e o aumento do volume do ejaculado, aumenta o número de doses para a inseminação artificial (AISEN, 2008). Os meios para criopreservação do sêmen caprino são constituídos à base de citrato de sódio, gema de ovo, lactose, água de coco, Tris e leite bovino desnatado em pó e reconstituído por um crioprotetor interno ou penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfóxido), sais (citrato de sódio ou ácido cítrico) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina) (PURDY, 2006).

2.6.1 - Crioprotetores não penetrantes

São substâncias constituídas por macromoléculas, lipídios e proteínas que não atravessam a membrana plasmática. As mais utilizadas são gema de ovo, leite, carboidratos (glicose, frutose, lactose, sacarose, manose, rafinose, trealose), polímeros sintéticos (polivinilpirrolidona e metilcelulose) e albumina sérica bovina (HOLT, 2000; LEBOEUF *et al.*, 2000). Essas substâncias tornam o meio hipertônico com o aumento da osmolaridade do meio extracelular, permitindo assim a passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo, desta forma, a formação de cristais de gelo no interior na célula durante a criopreservação (GONZALEZ, 2004).

2.6.2 - Diluentes a base de gema de ovo

A gema de ovo é um diluente usado rotineiramente na criopreservação de sêmen dos animais domésticos. O efeito protetor da gema de ovo sobre a membrana plasmática da célula espermática ocorre devido à presença das frações lipoproteicas de baixa densidade na sua composição. As lipoproteínas, como a fosfatidilcolina, presentes na gema de ovo, interagem com a estrutura lipídica da superfície celular, restaurando a perda de fosfolípidios que ocorre durante a mudança brusca de temperatura durante o resfriamento, prevenindo assim, a ruptura da membrana celular (FARSTARD, 1996). Essa interação ocorre principalmente na fase de equilíbrio (processo de resfriamento a cinco graus celsius).

A proteção promovida pelos lipídeos 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 (WILHELM *et al.*, 1996).

A gema de ovo previne também a liberação da enzima hialuronidase pela célula espermática (FOULKES, 1977). ABOAGLA & TEREDA (2004) sugerem que a adição de gema de ovo aos meios para o sêmen caprino aumenta substancialmente a proporção de espermatozoides viáveis recuperados após o descongelamento. BISPO *et al* (2011) avaliaram por meio de testes *in vitro* e de fertilidade *in vivo*, quais as concentrações de gema de ovo (Baixa: 2,5% ou Alta 20%) no diluidor glicose-EDTA preservam melhor o sêmen caprino congelado. Após o descongelamento, o diluente contendo baixa concentração de gema de ovo (2,5%) melhorou o congelamento do sêmen caprino, independentemente da estação reprodutiva.

2.6.3 - Diluentes a base de leite

O leite desnatado é considerado um dos diluentes de eleição para a espécie caprina, devido à presença de caseínas e pela fração lipídica. A eficiência das proteínas (caseínas) do leite na criopreservação do sêmen se assemelha ao da gema de ovo, por meio da sua composição proteica, que atua como tampão, e da propriedade quelante diante dos metais pesados, diminuindo os efeitos deletérios causados pela diminuição da temperatura (SALOMON & MAXWELL, 2000).

A viabilidade do sêmen na presença de diluente à base de leite é de aproximadamente 12 a 24 horas. O fosfocaseinato nativo é composto pelas caseínas do leite (a, b), foi destacado como sendo o componente mais eficiente em preservar a motilidade e manter a fertilidade do sêmen caprino estocado durante três dias, quando comparado a outros tipos de diluente (LEBOEUF *et al.*, 2003).

Apesar dos efeitos benéficos atribuídos ao leite, assim como na gema de ovo ocorre um efeito deletério entre o diluente a base de leite e a fração glicoprotéica do plasma seminal caprino (SBUIII) identificada por NUNES (1982), que é responsável por hidrolisar triglicerídeos de membrana plasmática e triglicerídeos no leite desnatado, resultando em um ácido graxo, o ácido oléico, que é tóxico aos espermatozoides (PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997).

2.6.4 - Crioprotetores penetrantes

Em geral são formados por moléculas com a capacidade de atravessar a membrana plasmática promovendo uma proteção intracelular das células espermáticas, porém, também atuam no meio extracelular, diminuindo as lesões de natureza química ou mecânica que o congelamento provoca no espermatozoide.

Possuem funções coligativas, diminuindo o ponto crioscópico intracelular permitindo assim a permanência da água no estado líquido sob baixas temperaturas. Além de diminuir a água intracelular e, conseqüentemente, o tamanho e o número de cristais de gelo (WATSON,

1995). São classificados em dois grupos: os alcoóis (etanol, glicerol, etilenoglicol, entre outros) e as amidas. Um bom agente crioprotetor permeável deve possuir baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (MEDEIROS *et al.*, 2002).

O glicerol é o crioprotetor de maior eleição para a criopreservação do sêmen caprino (RITAR *et al.*, 1990; KUNDU *et al.*, 2000; LEBOEUF *et al.*, 2000). O seu mecanismo de ação se dá pela redução da concentração do soluto nos meios intra e extracelulares, diminuindo a formação e tamanho de cristais de gelo (DALIMATA & GRAHAM, 1997) por meio de ligações de hidrogênio entre moléculas de água e seus três grupos funcionais de hidroxilas.

O crioprotetor pode causar danos osmóticos aos espermatozoides, mas cada espécie responde de maneira diferente em relação ao efeito do crioprotetor. Os espermatozoides caprino são ligeiramente tolerantes a essas condições e resistem de forma mais efetiva ao glicerol (MEDEIROS *et al.*, 2002). Apesar disso, o glicerol pode também produzir danos aos espermatozoides caprinos, por apresentar graus de toxicidade em concentrações acima de sete por cento (LEBOEUF *et al.*, 2000). Esses danos incluem mudanças nas estruturas citoplasmáticas, alteração da polimerização da tubulina e interferência direta nas proteínas da membrana plasmática (PARKS & GRAHAM, 1992).

Com isso, algumas substâncias têm sido utilizadas como uma alternativa para os diluidores de congelamento de sêmen, como os crioagentes do grupo dos alcoóis: etanol, etilenoglicol, metanol, polietilenoglicol e propilenoglicol; e as amidas, incluindo a acetamida, formamida, lactamida e dimetil-sulfóxido, além de outras (SNOEK, 2003).

2.6.5 - Diluente Beltsville Thawing Solution (BTS)

O BTS é um diluidor desenvolvido por PURSEL & JOHNSON (1975) para sêmen congelado na forma de pellet e adaptado para sêmen armazenado na fase líquida por JOHNSON *et al.*, (1988). É um diluente preconizado para conservação do sêmen suíno. Entretanto, alguns autores

PAULENZ *et al.*, (2005) têm utilizado esse diluidor na conservação de sêmen caprino. MURGAS *et al.*, (2007) afirmam que o BTS possui em sua fórmula componentes que, além de nutrirem células espermáticas e proteger a face intracelular da membrana citoplasmática, proporciona um microambiente osmoticamente favorável durante o congelamento (MURGAS *et al.*, 2007).

Este diluente contém baixas concentrações de potássio e parece manter a concentração intracelular deste íon em níveis fisiológicos durante o armazenamento. O EDTA na sua composição tem a função de capturar íons divalentes, principalmente Ca^{++} para prevenir a capacitação e o início da reação acrossomal (JOHNSON *et al.*, 2000).

O BTS apresenta glicose em sua formulação (Tabela 2), que, por sua vez, atua como crioprotetor externo à membrana citoplasmática dos espermatozoides e serve de substrato para a síntese de ATP. Segundo COSSON *et al.*, (1999), a fosforilação oxidativa mitocondrial é altamente requerida para produção de energia durante o batimento flagelar dos espermatozoides, de modo que a insuficiência de ATP constitui uma das principais causas da redução da motilidade espermática.

2.7- Antioxidantes

A adição de antioxidantes ao diluidor tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozoide do efeito tóxico das espécies reativas ao oxigênio (ROS). No entanto, a formação de pequenas quantidades de ROS exerce fundamental importância na viabilidade espermática, sendo que O_2^- e H_2O_2 participam do mecanismo de capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão esperma-ovócito em várias espécies (MAIA & BICUDO, 2009). Entretanto quando ocorre uma alteração na proporção em que a quantidade de radicais livres é superior a de antioxidantes, se inicia o estresse oxidativo, comprometendo assim a função espermática (SIKKA *et al.*, 1995).

O choque térmico durante o congelamento contribui para o aumento das reações oxidativas, aumentando assim o efeito destrutivo na membrana

espermática e no DNA dos espermatozoides (MAXWELL & WATSON, 1996). A oxidação da célula espermática provoca diminuição da fluidez da membrana e aumento de sua permeabilidade. Além disso, existe uma relação entre lipoperoxidação, motilidade e morfologia espermática. Sendo a peroxidação dos lipídios, considerada uma causa importante na disfunção espermática. Os espermatozoides caprinos são mais suscetíveis a peroxidação em relação aos espermatozoides bovinos, devido a maior proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados, tornando sua membrana mais susceptível aos danos por peroxidação na presença de ROS (ALVAREZ & STOREY, 1995). O sêmen congelado e descongelado é mais susceptível a peroxidação lipídica do que o sêmen fresco (BILODEAU *et al.*, 2000).

2.8 - Albumina sérica bovina

A albumina bovina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo bovino e serve como depósito, assim como transporte de proteína para numerosos componentes, como cadeia longa de ácidos graxos ou bilirrubina, ligados por alta afinidade a proteína (NAKAMURA *et al.*, 1997). A estrutura secundária da albumina bovina contém muitos resíduos de cistina e estes são helicoidais em grande parte da cadeia. É a principal proteína que contribui para a pressão coloidal osmótica do sangue e também para o transporte de proteínas para numerosos compostos endógenos e exógenos (TATTINI *et al.*, 2006). De acordo com UYSAL & BUCAK (2007) sua propriedade quelante permite inativar metabólitos do oxigênio gerados pelo estresse oxidativo mantendo a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides canino devido ao processo de criopreservação.

Também está relacionada à extração do colesterol da membrana plasmática. Este processo ocorrerá em áreas restritas da membrana, havendo devido a isto, um deslocamento dos fosfolipídios, levando-os a um novo rearranjo. Nas espécies onde a membrana é rica em colesterol (humanos e bovinos) tais eventos não são evidenciados na mesma velocidade como nas espécies com um baixo nível (suínos e ovinos). Frente

a isto, o tempo para capacitação varia, sendo verificada a necessidade de um maior tempo naquelas com altos níveis de colesterol na membrana (FLESCH & GADELLA, 2000; MAURER, 1992).

TWIGG *et al.*, (1998) analisando o efeito da formação no meio intracelular de espécies reativas ao oxigênio no meio intracelular de espermatozoides humanos, verificaram que a presença de albumina não protegeu contra os danos no DNA induzidos por NADPH, mas foi extremamente eficaz na prevenção da fragmentação do DNA resultante da supressão da glutathione peroxidase por meio da atividade com mercapto succinato. A albumina neutraliza o impacto do estresse oxidativo sobre os espermatozoides, pela ligação aos peróxidos de lipídios tóxicos gerados no interior da membrana plasmática durante a cascata de peroxidação lipídica.

2.9 - Resfriamento do sêmen

A curva de resfriamento é considerada o principal entrave no processo de criopreservação do sêmen (WATSON, 1995). Durante o resfriamento, a taxa de queda de temperatura entre 19 e 8 °C é um importante fator na ocorrência de alterações morfológicas e funcionais do espermatozoide, devido à ocorrência de mudanças irreversíveis na atividade metabólica da membrana plasmática do espermatozoide, levando à ruptura e perda de componentes celulares (GRAHAM, 1996).

O uso de curvas de resfriamento rápida (queda maior que 1 °C/min.), média (queda entre 1 a 0,3 °C/min.) e lenta (queda menor que 0,3 °C/min.) é descrito na literatura, principalmente em eqüinos (JASKO *et al.*, 1991). Segundo os autores, o uso de curvas de congelamento lento é somente necessário durante a faixa de temperatura na qual a célula espermática é mais suscetível ao choque térmico, entre 15 e 0 °C, diminuindo assim os danos.

O período de equilíbrio é o tempo no qual o espermatozoide permanece à temperatura de 4 a 5 °C antes do congelamento (WIGGIN & ALMQUIST, 1974). Esse tempo é necessário para que os espermatozoides interajam com os constituintes do meio (gema de ovo e crioprotetores) e

esses adquiram máxima resistência aos danos causados à célula espermática pelo processo de criopreservação (BOUCHARD *et al.*, 1990; ENGLAND, 1993). Diferentes períodos de equilíbrio são descritos para criopreservação do sêmen caprino (SAHNI & ROY, 1972; WAIDE *et al.*, 1997; DEKA & RAO, 1985). Segundo DEKA & RAO (1985), essa diversidade pode ser devido as diferenças na composição dos meios de congelamento utilizados durante a diluição do sêmen. DAS & RAJKKONWVAR (1995) e DUTTA *et al.*, (1996) disseram que o período de equilíbrio ideal para o congelamento de sêmen caprino encontra-se entre 1 e 4 horas. No entanto, RITAR *et al.*, (1990) sugerem que o sêmen caprino pode ser criopreservado sem o uso do tempo de equilíbrio, quando se utiliza um tempo de resfriamento de 1 a 1,5 hora (30 °C a 4 - 5 °C).

2.10 - Congelamento do sêmen

Poder armazenar o sêmen por um período indefinido de tempo e utilizá-lo a qualquer momento é com certeza uma das maiores vantagens que a criopreservação traz para os programas de Inseminação Artificial (IA). Essa técnica, iniciou a aproximadamente 50 anos com a descoberta do glicerol como crioprotetor (HOLT, 2000).

Em caprinos, o sêmen foi congelado pela primeira vez por SMITH & POLGE (1950), e os autores se reportaram à fertilidade pós-descongelamento do sêmen dessa espécie como muito baixa para ser considerada de valor prático. Muitas investigações têm sido desenvolvidas sobre a criopreservação do sêmen caprino e todas as etapas envolvidas no processo (LEBOEUF *et al.*, 2000).

Os eventos ocorridos durante a criopreservação envolvem os seguintes passos: redução da temperatura (como descrito no resfriamento), desidratação celular, congelamento e descongelamento (MEDEIROS, 2002).

A curva de congelamento é de extrema importância na manutenção da integridade celular. Quando a taxa é adequada, a célula torna-se progressivamente desidratada e permanece funcional após o descongelamento. Caso contrário ocorre perda da viabilidade das células,

possivelmente em função da diminuição do conteúdo de água intracelular, ocasionando aumento das concentrações de solutos intracelulares e precipitação, com alteração de pH e osmolaridade do meio (WATSON, 1995).

Os danos sofridos pelo espermatozoide durante o congelamento e o descongelamento ocorrem na faixa de temperatura entre - 15 e - 60 °C (PARKS & GRAHAM, 1992). Entretanto, o tipo de comprometimento celular dependerá da velocidade de congelamento. Dessa forma, a desidratação celular será observada quando a taxa de resfriamento oscilar entre 25 a 40 °C/min., enquanto o congelamento lento causa danos à célula, devido a altas concentrações de soluto intracelular durante o processo. Por outro lado, o resfriamento rápido (60 °C/min.) pode provocar a recristalização após o descongelamento, com formação de grandes cristais de gelo, o que causa danos físicos à célula (GRAHAM, 1996).

Apesar da praticidade e possibilidade de armazenamento do sêmen por período indeterminado, a viabilidade do sêmen congelado/descongelado em geral é menor do que quando se utiliza o sêmen resfriado. Apesar de imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelamento, os crioprotetores possuem efeitos tóxicos para o espermatozoide, tornando algumas substâncias utilizadas na criopreservação de outros tipos celulares impróprias para a célula espermática (WATSON, 2000).

2.11 - Exames complementares

2.11.1 - Teste de termorresistência

O teste de termorresistência (TTR) consiste na incubação de uma amostra de sêmen em banho-maria, por tempo pré-estabelecido e sob determinada temperatura, avaliando-se, ao longo do tempo, a motilidade progressiva e o vigor espermático (DIMITROPOULOS, 1967 citado por BORGES, 2003 e SANTOS *et al.*, 2006) no intuito de prever a fertilidade seminal.

O teste de termorresistência é utilizado para avaliar o comportamento (motilidade e vigor) dos espermatozoides quando incubados a 37 °C por três horas e, desta forma, predizer a fertilidade seminal (BARNABE *et al.*, 1981).

O teste de termorresistência rápido (30 minutos a 46 °C) utilizado na avaliação de sêmen congelado constitui-se como uma prova de grande aplicabilidade (ARRUDA, 1988), especialmente por sua correlação com fertilidade a campo. Outros trabalhos verificaram a associação da resistência dos espermatozoides imposta ao período de incubação estabelecido em testes de termorressistência com importantes implicações fisiológicas e práticas, sendo que as correlações com fertilidade *in vivo* e a campo mostraram – se presentes (VISHWANATH & SHANNON,1997).

2.11.2 - Teste hiposmótico (HOST)

O teste hiposmótico, desenvolvido por JEYENDRAN *et al.*, (1984) em sêmen humano, visa avaliar a integridade funcional da membrana espermática. Uma das propriedades da membrana plasmática é sua capacidade de permitir o transporte de moléculas seletivamente. Quando a célula espermática é exposta a um meio hipotônico, ocorre a passagem de água pela membrana plasmática para o interior da célula, numa tentativa de restabelecer o equilíbrio osmótico entre o meio intra e extra-celular. O aumento de volume ou “edemaciamento” do espermatozoide é particularmente visível na cauda, pois a membrana plasmática que a envolve parece ser mais frouxamente aderida à membrana que envolve a cabeça, por isso a região enrola-se com facilidade. De acordo com JEYENDRAN *et al.*, (1984) pode-se relacionar o enrolamento da cauda com uma boa funcionalidade da membrana da cabeça, já que no seu trabalho houve correlação positiva entre caudas enroladas e penetração do espermatozoide em oócitos de hamster.

O meio hiposmótico ideal deve exercer estresse suficiente para causar um aumento de volume observável ao microscópio de luz, sem causar a lise da membrana espermática. O HOST tem sido utilizado como protocolo de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de diversas

espécies: humanos (JEYENDRAN *et al.*, 1984), eqüinos (MELO, 1999), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), ovinos (OBERST *et al.*, 2003) e caprinos (FONSECA *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2001; SALGUEIRO *et al.*, 2003).

Trabalhando com sêmen caprino, FONSECA *et al.*, (2001) utilizaram uma solução hiposmótica formulada pela combinação de citrato de sódio (50%) e frutose (50%) em água destilada e testaram osmolaridades que variavam de 50 a 300 mOsmol/L. Os autores observaram que a maior percentagem de espermatozoides reativos ao teste e com um maior grau de reação (dobramento de cauda e edema) foi obtida em solução hiposmótica a 125 e 150mOsmol/L. SANTOS *et al.*, (2001) também encontraram bons resultados, trabalhando com um tempo de incubação de 60 minutos, a 37°C. Esse tempo é superior ao preconizado por CAIZA DE LA CUERVA *et al.*, (1997) que citam que o tempo ideal para que ocorram as reações é de 20 a 30 minutos.

Estudos têm demonstrado a correlação do HOST com a fertilidade *in vitro* do sêmen de touros (ROTA *et al.*, 2000), de hamsters (JEYENDRAN *et al.*, 1984) e com a motilidade espermática do sêmen canino descongelado (KUMI-DIAKA, 1993). Esse teste também é importante por acusar alterações intensas da funcionalidade espermática, em amostras que não seriam condenadas somente pelos resultados das avaliações de motilidade e morfologia espermáticas (MELO, 1999).

Após o período de incubação, as amostras do teste hiposmótico podem ser fixadas com solução de formol-salina tamponada para serem avaliadas futuramente, sem comprometer, com isso, os resultados (ALVES *et al.*, 2004 citado por BITTENCOURT *et al.*, 2005).

O cálculo do número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico pode ser realizado por intermédio da seguinte fórmula citada por BITTENCOURT *et al.*, (2005): $HOST\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HOST})$.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Local e período de experimentação

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Setor de Caprinocultura e no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, nas coordenadas geográficas de 20°45'14'', latitude sul, e meridiano 42°52'54'' longitude oeste, altitude média de 752,5 m de altitude. A temperatura média anual é de 18,5 °C, índice pluviométrico anual de 1221,4 mm e o clima da região é, segundo a classificação de Köppen, do tipo Cwa - clima tropical de altitude com inverno seco e verão chuvoso. O período experimental foi de outubro a novembro de 2011, período este em que os animais se encontravam em estação de monta induzida.

3.2 - Animais, alimentação e sanidade.

Foram utilizados como doadores de sêmen quatro reprodutores caprinos adultos com idade variando entre um ano e meio e três anos, das raças Alpina (n = 2) e Saanen (n = 2), hígidos e com histórico de fertilidade comprovada. Antes do período experimental, os animais foram submetidos ao exame andrológico e aprovados para reprodução, de acordo com os padrões seminais para a espécie do Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Os animais foram mantidos em baias individuais, com alimentação volumosa fornecida duas vezes ao dia composta de silagem de milho e concentrado protéico (550 g/ dia), bem como mistura mineral e água *ad libitum*, atendendo às exigências nutricionais dos reprodutores. O exame clínico dos animais foi realizado periodicamente.

3.3 - Coletas de sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas com intervalo de 48 horas, durante o período matutino, nos meses de outubro e novembro de 2011. Foram coletados cinco ejaculados por animal, totalizando 20 ejaculados. Foram utilizadas como manequim, fêmeas em estro induzido pela aplicação semanal de 1 mg de cipionato de estradiol pela via intramuscular. As fêmeas foram mantidas em tronco de contenção adequado para a espécie.

O método de coleta empregado foi o da vagina artificial modelo curto (Modificado de MIES FILHO, 1987) com água aquecida entre 42°C e 44°C no momento da coleta. Como revestimento da mucosa da vagina artificial, foram utilizados sacos plásticos em forma de funil (camisa sanitária), onde na extremidade mais estreita foi inserido um tubo de centrífuga de plástico graduado (15ml). Esse mesmo tubo foi revestido externamente com papel alumínio para evitar mudanças bruscas de temperatura e radiação solar. O tubo com o ejaculado foi encaminhado o mais rápido possível ao laboratório, para realizar avaliações físicas e logo após o processamento do sêmen para a criopreservação.

3.4 - Análises físicas do sêmen

Os tubos de coleta de sêmen ficaram em suportes sobre a bancada do laboratório, em temperatura ambiente, juntamente com o diluente de cada tratamento, os quais foram retirados do banho-maria a 37°C assim que o sêmen coletado chegou ao laboratório.

Todo material utilizado como lâminas, lamínulas, ponteiros e recipientes durante a avaliação do sêmen foi previamente aquecido a 37 °C em uma placa aquecedora.

O volume da amostra foi verificado por meio de leitura direta no tubo de coleta (graduado) e registrado em mililitros (mL).

O aspecto e coloração do ejaculado foram verificados visualmente e inferido valor de acordo com escalas pré-definidas para aspecto (1: aquoso, 2: leitoso, 3 cremoso) e coloração (1: branca, 2: branco-amarelada, 3: amarelada).

O turbilhonamento foi avaliado por meio da deposição de uma gota de sêmen (10µL) em lâmina, observando em microscópio de luz no aumento de 100X para posterior classificação em escala de zero a cinco, admitindo-se zero como ausência de parâmetro e cinco, como valor máximo para o movimento de massa.

Em uma lâmina escavada foi colocado 10 µL do sêmen e 100 µL do diluente, que depois de homogeneizado, foi retirada uma alíquota de 10 µL para realizar a avaliação da motilidade e vigor. A observação foi feita em microscópio de luz, no aumento de 200X, utilizando-se lâminas e lamínulas pré-aquecidas.

No parâmetro motilidade foram atribuídas notas percentuais subjetivas de zero a 100% em relação à quantidade de espermatozoides móveis totais, enquanto para o vigor, os valores de zero a cinco foram atribuídos conforme a intensidade e velocidade do movimento.

Para realização da concentração espermática, o sêmen foi diluído em água destilada, na proporção de 1:200 (água: diluidor), utilizando-se a pipeta de volume variável. Preenchida a câmara de Neubauer, o material foi levado ao microscópio de contraste de fase em aumento de 40 vezes para quantificação do número de células espermáticas por mL (FONSECA *et al.*, 1992).

3. 5 - Diluição do sêmen

Os tubos que continham o diluente para os diferentes tratamentos foram retirados do banho-maria e colocados sobre a bancada do laboratório (temperatura ambiente), juntamente com o sêmen recém - coletado. Após as avaliações físicas e cálculo da concentração do ejaculado, o diluente foi adicionado à amostra de sêmen para uma concentração final de 50×10^6 espermatozoides por mL.

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 mL, e lacradas com massa de modelar atóxica.

3. 6 - Resfriamento do sêmen

Após o envase, as palhetas foram colocadas em tubos de ensaio de vidro (15 mL). Em seguida, os tubos de ensaio revestidos por um refil (saco plástico) foram acondicionados em recipientes plásticos (240 mL) contendo 120 mL de álcool absoluto, e mantidos em temperatura ambiente. Logo após, o conjunto foi levado ao interior de uma geladeira, permanecendo na posição horizontal em temperatura de cinco graus Celsius, por uma hora, seguindo a curva de resfriamento (45 minutos) e tempo de equilíbrio (15 minutos), de acordo com FURST (2002).

3. 7 - Congelamento do sêmen

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando - se as palhetas que estavam em equilíbrio a 5°C, no botijão, a uma altura de 5 cm do nitrogênio, na posição vertical, por 15 minutos. Após este período, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido e, a seguir, acondicionadas em *canister* apropriado para serem armazenadas em botijão de nitrogênio líquido (FURST, 2006) até sua avaliação.

3. 8 - Delineamento experimental

Foram realizadas cinco coletas (partidas) em cada animal, totalizando 20 partidas no final do experimento. Em cada partida, foram realizados os testes e análises para cada um dos quatro tratamentos: bioxcell® (T1); BTS (T2); BTS + 5% BSA (T3) e BTS + 15% BSA (T4). Sendo que os tratamentos T2, T3 e T4 apresentavam em sua composição 2,5% de Gema de Ovo (BISPO, 2011) e 2,5% de etilenoglicol.

Os ejaculados após serem diluídos nos meios experimentais, sendo que os tratamentos (T3) e (T4) continham albumina sérica bovina – fração V (Vetec®) nas concentrações 5% e 15% respectivamente, foram envasados em palhetas de 0,25mL com concentração de 200 milhões de espermatozoides/mL, em seguida resfriados e congelados em nitrogênio

líquido (- 196°C). No momento da análise, as palhetas de sêmen foram descongeladas a 37 °C / 30 segundos. Em seguida realizou-se as análises físicas (motilidade e vigor espermático) e os testes complementares (TTR e hiposmótico).

3. 9 - Diluentes

Todos os diluentes utilizados no presente estudo são sumariados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Composição química do diluente referente ao grupo controle (BIOXCELL®).

CONSTITUINTE	g/L
Tris	2,3
Citrato de Sódio	6,2
Cloreto de Potássio	0,8
Frutose	1,2
Lactose Monohidratada	0,8
Glicina	0,2
Glicose Anidra	0,5
Taurina	0,005
Sulfato de Gentamicina	0,24
Tartarato de Tilosina	0,33
Lincospectina 100	0,383
Glicerol	40,2
Hidrato de Lactato de Cálcio	0,7
Lecitina de Soja	1,5
Ácido Cítrico Monohidratado	2,5
Água Ultra Pura q.s.p.	1000 mL

Fonte: IMV® - Brasil

Tabela 2 - Composição química do diluente Beltsville Thawing Solution® - BTS

CONSTITUINTE	(g/L)
Glicose	15,98
Citrato de sódio	2,542
EDTA	0,53
Bicarbonato de sódio	0,53
Cloreto de potássio	0,318
Sulfato de gentamicina	0,10
Água Ultra Pura q.s.p.	1000 mL

Fonte: minitube® - Brasil

Tabela 3 - Composição dos diluentes de cada tratamento.

TRATAMENTOS	COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES
T1	BIOXELL®
T2	BTS + Gema de ovo 2,5% + Etilenoglicol 2,5%
T3	BTS + Gema de ovo 2,5% + Etilenoglicol 2,5% + Albumina 5%
T4	BTS + Gema de ovo 2,5% + Etilenoglicol 2,5% + Albumina 15%

3. 10 - Descongelamento e análises do sêmen

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C, por 30 segundos e, posteriormente, secas em papel toalha evitando o atrito entre o papel e a palheta. Em seguida, realizaram - se as avaliações de rotina de acordo com os parâmetros mínimos exigidos pelo CBRA para o sêmen caprino descongelado, conforme a tabela 4, bem como a avaliação por meio de testes complementares, como o teste de termorresistência e o hiposmótico.

Tabela 4 - Valores mínimos para características seminais pós-descongelamento para bodes doadores de sêmen (CBRA, 1998).

PARÂMETROS	VALOR
Motilidade (%)	30
Vigor	2
Espermatozoides normais (%)	80
Concentração de espermatozoides /mL com motilidade progressiva	40 x 10 ⁶

Fonte: CBRA,1998.

3. 10. 1 - Teste de termorresistência

A longevidade dos espermatozoides foi avaliada pelo teste de termorresistência (TTR), que consistiu em colocar uma amostra de sêmen de 0,25 mL, referente a cada tratamento a ser avaliado, em micro tubo do tipo ependorff de 1,5mL, e incubando a 37 °C por um período de até 90 minutos. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados pelo TTR nos tempos de cinco, 30,60 e 90 minutos.

Para observação da motilidade e do vigor, os procedimentos adotados foram os mesmos descritos anteriormente para análise do sêmen fresco. No tempo de cinco minutos também foi retirada alíquota do sêmen para o teste de funcionalidade da membrana (teste hiposmótico).

3. 10. 2 - Teste hiposmótico

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo Teste hiposmótico, utilizando-se solução hiposmótica de 100 mOsmol/Kg como preconizado por SOUZA *et al.*, (2000) e por FONSECA *et al.*, (2001). Para o preparo da solução hiposmótica foram dissolvidos em 1000 mL de água deionizada, nove gramas de frutose e 4,9 g de citrato trissódico (REVELL & MRODE, 1994).

Uma alíquota de 20µL de sêmen foi adicionada a uma mL de solução hiposmótica e incubada por meia hora em banho-maria a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL de solução de formol-salina tamponada às amostras de sêmen para fixação das mesmas.

Posteriormente uma amostra foi montada entre lâmina e lamínula e analisada em microscopia de contraste de fase, em aumento de 400X, onde foram analisados 200 espermatozoides por amostra. Os espermatozoides foram classificados quanto à presença ou não de cauda enrolada, sendo classificados como normais aqueles que apresentaram cauda enrolada (reativos ao teste) e aqueles com cauda reta, foram classificados como membrana lesada.

3.11 - Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, as variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade (teste de Liliefors) e homocedastidade (teste de Cochram & Bartlet) e, posteriormente, à análise de variância (ANOVA), aplicando-se a comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro para aquelas que apresentaram significância no teste F.

A determinação das relações entre as características estudadas foi realizada pelo teste de correlação simples de Pearson, e a avaliação das médias e desvios-padrão da média, por meio de estatística descritiva.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Sêmen fresco

Os valores médios, com seus respectivos desvios padrão da média ($Média \pm S_x$) referente às características físicas, quantitativas e qualitativas do sêmen fresco estão sumariados na tabela 5. Os parâmetros estudados são considerados normais para o sêmen caprino (CBRA, 1998).

Tabela 5 - Volume, aspecto dos ejaculados, coloração, concentração, turbilhonamento, motilidade e vigor do sêmen fresco de caprinos.

Parâmetros	Freq (%)	Médias $\pm S_x$
Volume (mL)		1,18 $\pm$ 0,03
Aspecto		
Aquoso	5	
Leitoso	95	
Cremoso	0	
Coloração		
Amarelada	5	
Branco – amarelada	75,25	
Branca	19,75	
Concentração		4,00 $\pm$ 0,04 $\times 10^9$ /mL
Turbilhonamento (0 - 5)		3,13 $\pm$ 0,77
Motilidade (0 - 100 %)		80,32 $\pm$ 0,31
Vigor (0 - 5)		3,37 $\pm$ 0,02

Em relação a variável volume do ejaculado, os valores médios verificados foram de 1,18 $\pm$ 0,03 mL, valores estes dentro do preconizado pelo CBRA (1998), que é no mínimo 0,8 mL. De acordo com NUNES (2002) e HAFEZ (2004), o volume seminal de caprinos sofre variação de 0,2 a 2mL, sendo que animais da raça Alpina sofrem uma variação de volume de 0,6 e 1,3 mL, e animais da raça Saanen de 0,7 e 1,1mL, fora e dentro da estação reprodutiva respectivamente. O volume seminal obtido neste trabalho ficou dentro do intervalo de confiança dos valores obtidos por SANTOS *et al.*, (2006) e CASTILHO (2008) que foram de 1,1 $\pm$ 0,4 e 0,9 $\pm$ 0,3 respectivamente.

No parâmetro aspecto do sêmen é feita a avaliação da cor e da aparência. De acordo com HAFEZ (2004) os ejaculados foram classificados neste trabalho, quanto ao aspecto, em aquoso (5%), leitoso (95%) e cremoso (0%) (Tabela 5). A metodologia utilizada, para o parâmetro coloração foi feita de acordo com a classificação de três valores (1 = branca; 2 = branco - amarelada; e 3 = amarelada). Contudo, a coloração amarelada foi a menos observada (5%) nas avaliações realizadas nos ejaculados, predominando as cores branca (19,75%) e branco - amarelada (75,25%). Estes parâmetros estão correlacionados com a concentração espermática e uma eventual presença de urina, pus, sangue e demais componentes anormais no sêmen (SALVIANO & SOUZA, 2008). Nos caprinos, o sêmen se apresenta naturalmente mais amarelado (HAFEZ, 2004) e, na maioria das vezes, é devido a presença do plasma em grande quantidade. No entanto quanto mais branco for o ejaculado, maior será a concentração espermática (HAFEZ, 2004).

A concentração espermática média observada foi de $4,00 \pm 0,04 \times 10^9$ espermatozoides/mL (Tabela 5), resultados semelhantes aos verificados por DIAS (2010) $3,33 \pm 0,2 \times 10^9$ e PENITENTE (2010) $3,35 \pm 0,23 \times 10^9$. Os resultados deste trabalho também se encontravam dentro do mesmo intervalo de confiança (95%) relatado por esses autores. De acordo com MIES FILHO (1987), a concentração de espermatozoides na espécie caprina varia de 1,0 a 5,0 bilhões de espermatozoides/mL, sendo a média 3,0 bilhões. Para HAFEZ (2004) a concentração espermática em caprinos se apresenta variando de 2,5 a 5,0 bilhões de espermatozoides/mL.

O turbilhonamento é o resultado da ação conjunta entre os parâmetros de concentração, motilidade e vigor espermático. Neste trabalho, o turbilhonamento apresentou média de $3,13 \pm 0,77$ (Tabela 4), concordando com os $3,9 \pm 0,1$ encontrados por SILVA (2006), aos $3,6 \pm 0,23$ verificado por SANTOS (2010) e aos $4,06 \pm 0,66$ relatados por MARTINS *et al.*, (2006), sendo considerados dentro do recomendado pelo CBRA (1998). Fatores de natureza externa como método de colheita, temperatura e forma de manipulação da amostra prejudicam a avaliação do turbilhonamento real do ejaculado.

A motilidade envolve o percentual de células móveis presentes no ejaculado. Nesse experimento, a motilidade do sêmen fresco foi de $(80,32 \pm 6,19\%)$ (Tabela 5) avaliação considerada acima do valor mínimo exigido pelo CBRA (1998) para o sêmen caprino *in natura* que é de 70%. Esses resultados são semelhantes aos valores de $82,33 \pm 9,79$ encontrados por BISPO (2005), e de $82,87 \pm 7,32$ encontrados por MARTINS *et al.*, (2006).

Da mesma forma, o vigor espermático apresentou valor médio $3,37 \pm 0,39$ próximos aos $3,93 \pm 0,41$ reportados por BISPO (2005) e aos $3,35 \pm 0,46$ relatados por MARTINS *et al.*, (2006). Esses valores encontram-se dentro do preconizado para a espécie (CBRA, 1998).

5. 2 - Sêmen descongelado

Todas as partidas descongeladas atenderam aos requisitos mínimos exigidos para o sêmen caprino descongelado, em relação aos aspectos de motilidade espermática ($>30\%$) e vigor espermático pós-descongelamento (>2), de acordo com as exigências do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Na tabela 6 estão sumariados os valores para motilidade e vigor do sêmen descongelado no teste de termorresistência (TTR) para os quatro tratamentos experimentais.

A maior parte dos parâmetros do sêmen analisado na pós-descongelação atendeu às normas do CBRA (Tabela 4) no início do TTR (Tabela 6 – Tempo 5')

Observa-se, pelos dados apresentados, que a longevidade do sêmen não apresentou os parâmetros mínimos (motilidade 15% e vigor 3) preconizados pelo CBRA (1998) ao final do TTR para os tratamentos. Sendo que apenas a motilidade do grupo bioxcell, apresentava valor mínimo recomendado pelo CBRA (1998).

Os resultados do TTR evidenciaram de um modo geral, queda brusca dos parâmetros de motilidade espermática progressiva e vigor, ao longo de 90 minutos de duração do teste, o que também foi observado por

PENITENTE (2010), ao avaliar a longevidade do sêmen caprino após o descongelamento utilizando do mesmo diluente para o grupo bioxcell.

Tabela 6 – Valores médios, desvios-padrão da média para motilidade e vigor no teste de termorresistência do sêmen caprino descongelado para os diferentes tratamentos experimentais e em função do tempo (minutos).

TEMPOS (minutos)	TRATAMENTOS			
	BIOXCELL	BTS	BTS + BSA 5%	BTS + BSA 15%
5' Mot	32,25 ± 0,45 ^a	34,00 ± 0,46 ^a	36,00 ± 0,39 ^a	35,75 ± 0,38 ^a
5' Vig	2,7 ± 0,03 ^b	3,37 ± 0,03 ^a	3,45 ± 0,02 ^a	3,5 ± 0,02 ^a
30' Mot	25,5 ± 0,36 ^a	21,00 ± 0,56 ^a	22,00 ± 0,43 ^a	24,25 ± 0,44 ^a
30' Vig	2,35 ± 0,02 ^a	2,32 ± 0,04 ^a	2,3 ± 0,03 ^a	2,47 ± 0,03 ^a
60' Mot	20,5 ± 0,35 ^a	6,5 ± 0,38 ^b	6,75 ± 0,37 ^b	7,75 ± 0,35 ^b
60' Vig	1,95 ± 0,02 ^a	0,77 ± 0,04 ^b	0,85 ± 0,03 ^b	0,95 ± 0,04 ^b
90' Mot	15,5 ± 0,42 ^a	1,00 ± 0,13 ^b	2,00 ± 0,24 ^b	1,25 ± 0,15 ^b
90' Vig	1,52 ± 0,03 ^a	0,2 ± 0,02 ^b	0,22 ± 0,02 ^b	0,2 ± 0,02 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey. BTS - Beltsville Thawing Solution; BSA - Bovine serum albumin; Mot - motilidade progressiva; Vig - vigor.

A adição de albumina sérica bovina nas concentrações de 5% e 15%, em relação ao grupo bioxcell, não afetou a queda da motilidade progressiva do sêmen descongelado, submetido ao teste de termorresistência de 5, 30, 60 e 90 minutos.

Os tratamentos experimentais BTS, BTS + BSA 5% e BTS + BSA 15% (Tabela 6) iniciaram o TTR com motilidade maior que a do bioxcell. No entanto, apresentaram queda acentuada na motilidade e menor longevidade espermática. Porém, o grupo com BSA 5% teve uma média relativamente maior no tempo 5 minutos, mas não apresentou diferença significativa (P>0,05), em relação aos demais grupos experimentais. É possível que fatores diversos como acondicionamento espermático e/ou velocidade de congelamento e descongelamento, além de modificações físico-químicas no diluidor durante o crioprocessamento tenham influenciado os resultados apresentados nesse experimento.

O declínio da motilidade espermática verificado no TTR, pode ser devido a lesões estruturais das membranas das células espermáticas, provocando assim, perdas dos componentes intracelulares decorrentes tanto do processo de congelamento como de descongelamento (WATSON, 1995).

Com exceção do bioxcell, os valores encontrados para motilidade espermática neste trabalho estão baixos em relação aos valores observados no teste hiposmótico. O teste hiposmótico é um teste quantitativo e a motilidade uma avaliação subjetiva. Porém, geralmente os seus valores ficam próximos, desde que a avaliação da motilidade seja realizada com critério. Como o teste hiposmótico avalia a funcionalidade da membrana da célula espermática, caso a sua funcionalidade esteja comprometida, é grande a probabilidade do espermatozoide estar sem motilidade ou sofrer uma diminuição em seu vigor.

Neste trabalho apenas o grupo controle do teste hiposmótico (Tabela 7) apresentou médias semelhantes ao valor encontrado no descongelamento no tempo cinco minutos do grupo controle do TTR, indicando que no descongelamento as células espermáticas poderiam apresentar motilidade mas com a presença de lesões na sua membrana.

Tabela 7 – Valores médios e desvios-padrão do teste hiposmótico (% de células funcionais) do sêmen descongelado, entre os tratamentos.

Teste	Tratamentos			
	Bioxcell	BTS	BTS + BSA 5%	BTS + BSA 15%
HostSD	35,95 0,70 ^a	19,1 ± 0,32 ^b	15,9 ± 0,36 ^b	17,1 ± 0,39 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. HostSD - teste hiposmótico do sêmen descongelado.

A membrana plasmática do espermatozoide é composta de diversos compartimentos com diferenças estruturais e funcionais, integrando desta forma um mosaico fluido de domínios específicos, com funções distintas e especializadas (KNOBIL & NEILL, 2006). Em função disto, outras avaliações específicas, como o uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade do acrossoma, integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial são necessárias para a caracterização dos diferentes aspectos e estruturas da membrana, bem como, do seu efeito protetor.

A utilização de sondas fluorescentes possibilita uma avaliação mais criteriosa dos compartimentos estruturais da membrana, assim como a sua funcionalidade e com isso explicar a queda brusca da motilidade durante o teste de termorresistência. As células espermáticas apresentaram motilidade

após o descongelamento, porém as membranas poderiam estar alteradas e, assim, não permitirem a sobrevivência dos espermatozoides por um período maior. Somente o teste hiposmótico é insuficiente para tal conclusão, uma vez que ele mostra aqueles espermatozoides que possuem a membrana afuncional impedindo desta forma o dobramento da cauda. No entanto as membranas poderiam não estar totalmente danificadas, mas alteradas ao ponto de não suportarem o desafio da temperatura (37°C) por um período maior.

A realização da inseminação artificial com o sêmen acrescido dos diluentes seria conclusivo para verificar se o tempo de sobrevivência apresentado a uma temperatura de 37°C é suficiente para realizar a fertilização.

Na tabela 8 estão sumariadas as correlações de Pearson entre os parâmetros físicos, a motilidade do sêmen fresco e descongelado e o teste hiposmótico para o tratamento bioxcell.

Foi encontrada correlação negativa entre vigor do sêmen fresco e do sêmen descongelado ($r = -0,38$), mostrando que quanto maior o vigor do sêmen fresco menor era do sêmen descongelado, sugerindo uma diminuição da energia metabólica no descongelamento com um aumento do gasto energético inicial da célula espermática. Na mesma tabela observa-se uma correlação positiva da motilidade espermática no descongelamento com o vigor do sêmen descongelado, mostrando que quanto maior a presença de células móveis maior a velocidade de sua movimentação.

Foi verificada correlação negativa entre o volume e a concentração ($r = -0,38$ $P < 0,05$) (Tabela 8), demonstrando que quanto menor o volume do sêmen observado no ejaculado, maior a concentração espermática do mesmo.

A motilidade do sêmen fresco apresentou correlação positiva ($r = 0,60$ $P < 0,05$) (Tabela 8) com o turbilhonamento em que um aumento no movimento de massa da amostra avaliada, aumenta a motilidade progressiva da célula espermática. No entanto, a motilidade do sêmen fresco apresentou correlação negativa ($r = -0,42$ $P < 0,05$) (Tabela 8) com o volume do ejaculado, mostrando que a presença de um menor volume do sêmen, aumenta a motilidade do sêmen fresco.

Tabela 8 - Correlações Simples de Pearson para aspectos físicos do sêmen fresco e descongelado, e também a avaliação hiposmótica do sêmen descongelado para o tratamento bioxcell.

TRATAMENTO BIOXCELL								
	VOLUME	TURB	CONC	MotSF	VGSF	MotSD	VGSD	HOST
VOLUME	1	- 0,23	- 0,38*	- 0,42*	- 0,36	0,11	0,28	0,33
TURB		1	0,04	0,60*	0,02	0,11	0,30	- 0,13
CONC			1	0,22	0,30	- 0,05	- 0,05	0,19
MotSF				1	0,08	0,14	0,33	- 0,15
VGSF					1	0,34	- 0,38*	- 0,21
MotSD						1	0,54*	- 0,03
VGSD							1	0,30
HOST								1

Valores seguidos por (*) apresentam correlação significativa ($P < 0,05$). TURB - turbilhonamento; CONC - concentração; MotSF - motilidade do sêmen fresco; VGSF - vigor do sêmen fresco; MotSD - motilidade do sêmen descongelado; VGSD - vigor do sêmen descongelado; HOST - teste hiposmótico do sêmen descongelado.

Observa-se na tabela 9 uma correlação negativa ($r = -0,55$) do turbilhonamento e o teste hiposmótico no tratamento em que não houve adição de BSA. Contudo houve uma correlação positiva entre a motilidade do sêmen descongelado com o vigor do mesmo ($r = 0,59$), podendo explicar a diminuição de células funcionais em que um aumento da motilidade e do vigor, aumentaria a produção de metabólitos reativos ao oxigênio, comprometendo assim a funcionalidade da membrana o que possivelmente pode ser explicado pela diminuição de células que apresentaram o dobramento da cauda devido a choque osmótico.

Tabela 9 - Correlações Simples de Pearson dos aspectos físicos do sêmen fresco e descongelado, e também a avaliação hiposmótica do sêmen descongelado para o tratamento BTS.

TRATAMENTO BTS								
	VOLUME	TURB	CONC	MotSF	VGSF	MoTSD	VGSD	HostSD
VOLUME	1	- 0,23	- 0,38*	- 0,42*	- 0,36	0,07	0,11	- 0,10
TURB		1	0,04	0,60*	0,02	- 0,05	0,29	- 0,55*
CONC			1	0,22	0,30	- 0,19	0,06	0,34
MotSF				1	0,08	- 0,10	0,17	- 0,16
VGSF					1	- 0,18	- 0,26	- 0,10
MoTSD						1	0,59*	- 0,15
VGSD							1	- 0,14
HostSD								1

Números seguidos por (*) apresentam correlação significativa ($P < 0,05$). BTS - Beltsville Thawing Solution; BSA - Bovine serum albumin TURB - turbilhonamento; CONC - concentração; MotSF - motilidade do sêmen fresco; VGSF - vigor do sêmen fresco; MoTSD - motilidade do sêmen descongelado; VGSD - vigor do sêmen descongelado; HostSD - teste hiposmótico do sêmen descongelado.

Observa-se pelos dados apresentados na tabela 10 uma correlação positiva entre a concentração e o teste hiposmótico ($r = 0,42$), mostrando que quanto maior a concentração espermática, maior a presença de células reativas ao teste hiposmótico quando a concentração de BSA é 5%.

De forma geral, as correlações entre motilidade e teste hiposmótico não mantiveram um padrão de comportamento, dessa forma, não é possível afirmar que a motilidade progressiva é um bom parâmetro para a predição da integridade funcional da membrana espermática.

O parâmetro motilidade espermática parece não ser isoladamente eficaz em prever a viabilidade espermática de sêmen congelado para uso em programas de inseminação artificial, sendo necessário uso de testes complementares que possam elevar a acurácia em prever a fertilidade do sêmen (CASTILHO, 2009). Tal observação é respaldada pelo presente experimento em que os valores médios obtidos no teste hiposmótico foram inferiores aos da motilidade espermática, indicando menor concentração de espermatozoides viáveis e com potencial por dose.

Tabela 10 - Correlações simples de Pearson dos aspectos físicos do sêmen fresco e descongelado, e também a avaliação hiposmótica do sêmen descongelado para o tratamento BTS + BSA 5%.

TRATAMENTO BTS + BSA 5%								
	VOLUME	TURB	CONC	MotSF	VGSF	MotSD	VGSD	HostSD
VOLUME	1	- 0,23	- 0,38*	- 0,42*	- 0,36	- 0,23	0,17	0,13
TURB		1	0,04	0,60*	0,02	- 0,19	- 0,04	- 0,26
CONC			1	0,22	0,30	- 0,23	- 0,02	0,42*
MotSF				1	0,08	0,01	0,13	- 0,17
VGSF					1	- 0,21	- 0,29	- 0,24
MotSD						1	0,20	- 0,21
VGSD							1	0,01
HostSD								1

Números seguidos por (*) apresentam correlação significativa ($P < 0,05$). BTS - Beltsville Thawing Solution; BSA - Bovine serum albumin; TURB - turbilhonamento; CONC - concentração; MotSF - motilidade do sêmen fresco; VGSF - vigor do sêmen fresco; MotSD - motilidade do sêmen descongelado; VGSD - vigor do sêmen descongelado; HOST - teste hiposmótico do sêmen descongelado.

Na tabela 11 não foram encontradas correlações significativas entre os diferentes parâmetros para o sêmen descongelado sob efeito do tratamento BTS + BSA 15%.

O BTS é um diluidor desenvolvido e empregado extensivamente para conservação do sêmen suíno. Entretanto tem sido utilizado em pesquisas com peixes de piracema (MURGAS *et al.*, 2007) entretanto não possui albumina sérica em sua composição. A adição da BSA aos diluentes tem apresentado resultados variáveis entre as espécies. Em suínos a presença da BSA (fração V) em diluentes Modified-Zorlesco (ZOR) e BTZOR, proporcionou melhores condições aos espermatozoides, em função de suas propriedades anti-aglutinantes e anti-tóxicas (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Em cães, RODRIGUES, B.A. (1997) demonstrou que a adição de BSA no diluidor TRIS-gema de ovo é eficaz no congelamento de sêmen canino, porém não foram verificadas diferenças significativas na percentagem de integridade acrossômica entre as três concentrações testadas (0,25%, 0,50% e 1,00%).

Tabela 11 - Correlações Simples de Pearson entre aspectos físicos do sêmen fresco e descongelado, e também a avaliação hiposmótica do sêmen descongelado para o tratamento BTS + BSA 15%.

TRATAMENTO BTS + BSA 15%								
	VOLUME	TURB	CONC	MotSF	VGSF	MotSD	VGSD	HostSD
VOLUME	1	- 0,23	- 0,38*	- 0,42*	- 0,36	- 0,24	0,16	0,25
TURB		1	0,04	0,60*	0,02	0,04	0,36	0,12
CONC			1	0,22	0,30	0,09	0,16	0,35
MotSF				1	0,08	0,32	0,11	- 0,07
VGSF					1	0,20	- 0,05	- 0,16
MotSD						1	- 0,09	- 0,26
VGSD							1	0,30
HostSD								1

Números seguidos por (*) apresentam correlação significativa ($p < 0,05$). BTS - Beltsville Thawing Solution; BSA - Bovine serum albumin TURB – turbilhonamento; CONC – concentração; MotSF – motilidade do sêmen fresco; VGSF – vigor do sêmen fresco; MotSD – motilidade do sêmen descongelado; VGSD – vigor do sêmen descongelado; Host – teste hiposmótico do sêmen descongelado.

No presente estudo verificou-se que a adição de BSA ao BTS modificado na criopreservação de sêmen caprino não afetou os parâmetros seminais: motilidade, vigor, longevidade, nem a integridade funcional da membrana espermática.

A questão relativa à capacidade antioxidativa seguinte ao descongelamento de sêmen permanece sem ser elucidada. Mudanças na composição do diluente com um ambiente hipertônico, concentrações dos aditivos antioxidantes não melhoram os parâmetros de qualidade do sêmen (MAIA & BICUDO, 2009).

Apesar de vasta literatura a respeito da utilização de antioxidantes, são requeridos estudos adicionais com maior número de concentrações de BSA entre os tratamentos para uma melhor compreensão das mudanças bioquímicas e obter informações na formação excessiva de radicais livres e capacidades antioxidantes no sêmen caprino criopreservado.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo conclui-se que a adição de albumina sérica bovina (fração V) no BTS modificado não afetou nenhum dos parâmetros avaliados neste estudo.

Não houve o efeito protetor esperado do diluente BTS modificado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOAGLA, E.M.F.; TEREDA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62 p.1160-1172, 2004.
- AISEN, E.G. **Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: MedVet, v.1, 203p., 2008.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p.334-346, 1995.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, p. 715-745, 1993.
- AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**. v.7, p.145-173, 1987.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2010.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação do sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termorresistência: efeitos sobre a fertilidade**. São Paulo, 1988. 41f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, p.91-148, 1995.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**, 1° edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p.285, 1989.
- BARNABÉ, V.H.; BARNABÉ, R.C.; VISINTINI, J.S. Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termo resistência para avaliação de sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 4, p. 7-12, 1981.
- BEYGI, A; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, p.117, 2007.
- BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRRARD, M. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p. 282-288, 2000.

BISPO, C.A.S. **Avaliação “in vitro” do sêmen caprino resfriado a 5 °C em função de curvas de resfriamento e diluidores.** 2005. 79f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

BISPO, C.A.S.; PUGLIESI, G.; GALVÃO, P.; RODRIGUES, M.T.; KER, P.G.; FILGUEIRAS, B.; CARVALHO, G.R. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.100, p.54-58, 2011.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A.D.F.; CHALHOUB, M; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; LEANDRO, E.E.S.; GUIMARÃES, J.D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**. v. 6, p. 213-218, 2005.

BORGES, J.C. **Utilização de antioxidantes associados ou não o emulsificante na criopreservação do sêmen bovino.** 2003. 73f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D.; YOUNGQUIST, R.S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. **Theriogenology**, v.34, p.147-157,1990.

CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; RIGAU, T.; BONET, S. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effect of ouabain. **Theriogenology**, v. 47, p. 765-784, 1997.

CASTILHO, E.R.; GUIMARÃES, J.D.; MARTINS, L.F.; PINHO, R.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; ESPECHIT, C.J.B. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2335-2345, 2009.

CHEMINEAU, P. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. **Reproduction Nutrition Development**, v. 26, p. 453-460, 1986.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 54p, 1998.

COMHAIRE, F.H.; MAHMOUD, A.M.A.; DEPUYDT, C.E.; ZALATA, A.A.; CHRISTOPHE A.B. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potencial: the andrologist' s viewpoint. **Human Reproduction**. v. 05, p. 393-398, 1999.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. **Current Veterinary Therapy**. v. 4, p. 1247-1259. 1989.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, p.162-186. 1999.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. **Theriogenology**, v.49, 831-841, 1997.

DAS, K.K.; RAJKONWAR, C.K. Acrossosomal changes of Buck spermtozoa after equilibration and freezing in egg yolk citrate glycerol extender. **Indian Veterinary Journal**, v. 73, p. 35-40, 1995.

DIAS, J.C.O. **Adição de ringer Lactato, citrato de sódio 2,92% e solução tris em sêmen caprino descongelado**. 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

DEKA, B.C.; RAO, A.R. Effect of glycerol level in Tris based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. **Theriogenology**, v.26, p. 231-239, 1985.

DUTTA, S.; GHOSH, B.B.; BONDYOPADHYAY, S.K. et al. Effect of different extenders, glycerol levels and equilibration times on deep-freezing of Buck semen. **Indian Journal Animal Health**, v. 35, p. 35-38, 1996.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog sêmen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 243-255, 1993.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Australia: Butterworths Pty Limited, 194p. 1987.

FARSTARD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v.42, 251-260, 1996.

FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1469, p. 197-235, 2000.

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Editora Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 72p. 1992.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; SANTOS, A.D.F.; ROVAY, H. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.25, p 436-438, 2001.

FOULKES J. A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.49, 277-284, 1977.

FÜRST, R. **Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade**. 2002. 46f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.

FÜRST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen eqüino**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sob parâmetros espermáticos e a integridade de membranas no espermatozoide bovino**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2004.

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

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

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

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

IRITANI, A. J.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg yolk coagulating enzyme in goat sêmen. **Japanese journal of Zootecnical Science**, v.10, p.57-64, 1964.

JASKO, D. J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, p.1059-1067, 1991.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VER, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. Developement of na assay the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.70, p. 219-228, 1984.

JOHNSON, L.A. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in BTS. Modified Modena (MM), or MR – A and inseminated on one three and four days after collection. **Zuchthygiene**, New York, v.23, n.2, p. 49-55. 1988.

JOHNSON, L.A. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.3, p. 143-172, Aug. 2000.

JONES, R., MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**.v.50, p 255-260, 1977.

KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Physiology of Reproduction**. 3 ed. Elsevier Academic Press USA. 2006.

KODAMA, H.; KURBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v.17, p. 151-157,1996.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hyposmotic test. **Theriogenology**, v.39,p.1279-1289, 1993.

KUNDU, C.N., CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G.C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.40, p. 117-125, 2000.

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

LEBOEUF, B.; GUILLOUET, P.; BATELLIER, F.; Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**. V.60, p. 867-877, 2003.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier. 4ed. São Paulo. 2005.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.33, p.183-193, 2009.

MARTINS, L.F.; PEREIRA, M.C.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; SILVEIRA, T.S.; TORRES, C.A.A.; RODRIGUES, M.T.; BRAZ, V.B. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1653-1659, 2006.

MAURER, H.R. **Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture: A practical approach**. 2 ed. Oxford University Press, p. 15-46. 1992.

MAXWELL, W.M.C, WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**.v42,1-4, p 55-65, 1996.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v.247, p. 251-272, 1977.

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

MELO, M.I.V. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino**.1999. 67f. Tese (Doutorado em Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, v.2, 701p, 1987.

MURGAS, L.D.S.; MILIORINI A.B.; FREITAS R.T.F.; PEREIRA G.J.M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n.3, p. 526-531, 2007.

NAKAMURA, K.; ERA, S.; OZAKI, Y.; SOGAMI, M.; HAYASHI, T.; MURAKAMI, M. Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. **Federation European of Biochemistry**. V.417, p. 375-378, 1997.

NUNES, J. F. Inseminação Artificial em Caprinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002

NUNES, J.F., CORTEEL, J.M., COMBARNOUS, Y., BARIL, G. Role Du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoids de bouc. **Reproduction Nutrition Développement**. V.22, p. 611-620, 1982.

OBERST, E. R.; JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C.; KROTH, E.; LARA, G. SMIDERIE, W.; BRONZATTO, M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos para avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p.375-376, 2003.

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

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

PAULENZ, H. ; SOLTUM, K. ; ÅDNØY, T. ; ANDERSEN BERG, K. ; SODERQUIST, L. Effect of different extenders on sperm viability of buck semen stored at room temperature. **Small Ruminant Research**, v. 59, p. 89-94, 2005.

PELLICER-RUBIO, M.T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biology of Reproduction**, v.27, p. 1023-1031, 1997.

PENITENTE, J. M. **Adição da vitamina E na criopreservação do sêmen caprino**. 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2010.

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

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of animal Science**, v.40, p. 99-102, 1975.

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

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluents on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Australian Journal of Biological Science**, v. 35, p. 305-312, 1982.

RITAR, A. J.; BALL, P.D.; O'MAY, P.J. Artificial insemination of cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. **Reproduction Fertility and Development**, v.2, p. 377-384, 1990.

RODRIGUES B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado**.1997 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 1997.

ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; MONTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p. 1415-1420, 2000.

SAHNI, K.L.; ROY, A. A study the effect of deep freezing (- 79 °C) on post thawing revival of sheep and goat spermatozoa. **Indian Journal Animal Science**, v. 42, p. 102-105, 1972.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram sêmen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SALGUEIRO, C.C. de M.; NUNES, J.F.; MATEOS - REX, E.; CORDEIRO, M.A.; MAGALHÃES, D.M.; CAVALCANTE, J.M.M; PALÁCIO, A.R.S. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, 2003.

SALVIANO, M.B.; SOUZA, J. A. T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.159-167, 2008.

SANTOS, M.C.R. **Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação dos espermatozoides caprinos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2010.

SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; BORGES, A.M.; ROVAY, H.; GORETTI, R.G.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P. BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V.; FRAGA, D.B.M. 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**, v.25, n.3, 2001.

SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; BORGES, A.M.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E. P.; ROVAY, H. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p. 1934-1942, 2006.

SILVA, A.R.; FONTENELE, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; LOPES, M.D. Descrição de danos ultra-estruturais em espermatozoides caninos criopreservados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba-PR. **Anais...** Belo Horizonte- MG: CBRA, v.1, p.168, 2007.

SIKKA, S.C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J.G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Andrology**, v.16, p.464-468, 1995.

SILVA, A. F.; COSTA, E.P.; OLIVEIRA, F.A.; TORRES, C.A.A.; HASS, G.T.S.; NASCIMENTO V. A. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.2, p.452-456, 2006.

SIMPLÍCIO, A. A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte. **Anais....** Belo Horizonte: CBRA, p.171-177, 1989.

SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes, **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972.

SMITH, A.H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v.166, p.668-671, 1950.

SNOECK, P.P. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade**. 2003, 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

SOUSA, J.P.F.; BARBAS, J.P.; FERREIRA, G.M.B.C.; HORTA, A.E.M. Variação anual das características seminais em bodes da raça Serrana. In: Congresso de Zootecnia – “Progressos Zootécnicos nos Países de Língua Portuguesa”, **Anais...** Vale de Santarém, p.87. 2000.

SQUIRES, E.L.; PICKET, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Principles of cryopreservation. In: **Cooled and frozen Stallion Semen**, v.9, 1999.

TATTINI, V.; PARRA, D.F.; PITOMBO, R.N.M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42 p.127-136, 2006.

TULI, R.K.; HOLTZ, W. Seminal characteristics of Boer goat bucks as affected by months and seasons of the year. In: CONFERENCE INTERNATIONAL ON GOATS, New Delhi, India, 1992. **Proceedings...** New Delhi, India, p.311, 1992.

TWIGG, J.P.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.13, p.1864-1871, 1998.

UYSAL, O.; BUCAK, M.N. Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v.6, p.1362-1366, 2007.

VASCONCELOS, A.M.M.S.; MORAES, G.V.; RIGOLON, L.P.; MOREIRA, I.; MARTINS, E.N. Efeito de Sêmen Resfriado e Diluído em Beltsville Thawing Solution, Zorlesco-modificado e BTZOR no Desempenho Reprodutivo de Fêmeas Suínas Inseminadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 2, p.402-408, 2001.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.871-891, 1997.

WAIDE, Y.; NIWA, T.; ASANUMA, R. Studies on preservation of liquid and frozen sêmen of domestic animals. 3. Viability and fertility of frozen goat sêmen. **Japanese Journal Animal Reproduction**, v. 23, p. 129-137, 1997.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 481- 492, 2000.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 871-891,1995.

WIGGIN, H.B.; ALMQUIST, J.O. Combinations of glycerol percent, glycerol equilibrium time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 416-419, 1974.