

GISELLE DIAS DE OLIVEIRA

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE RESFRIAMENTO PRÉ-
CONGELAMENTO NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN
DESCONGELADO DE CAPRINO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

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

T

O48e
2013

Oliveira, Gisele Dias de, 1981-

Efeito dos diferentes tempos de resfriamento
pré-congelado na viabilidade espermática do sêmen
descongelado de caprino / Gisele Dias de Oliveira. – Viçosa,
MG, 2013.

ix, 41f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-41.

1. Caprino - Sêmen - Criopreservação. 2. Sêmen.
3. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.39089

GISELLE DIAS DE OLIVEIRA

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE RESFRIAMENTO PRÉ-
CONGELAMENTO NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN
DESCONGELADO DE CAPRINO**

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

APROVADA: 30 de abril de 2013.

Prof. Dr. Ciro Alexandre Alves Torres

Prof. Dr. Eduardo Paulino da Costa
(Coorientador)

Prof. Dr. José Domingos Guimarães
(Coorientador)

Prof. Dr. Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

Para o homem, o anjo é o gênio que representa a Providência Divina, e para o animal, o homem é a força que representa a Divina Bondade.

Emmanuel

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado e me abençoado durante todo esse caminho que percorri até chegar aqui, pois somente nós dois sabemos o quanto foi árduo e sofrido em alguns momentos. OBRIGADA SENHOR!!!

Agradeço em especial minha mãe, Elisabete Dias, por todo apoio e compreensão naqueles momentos em que tanto precisou de minha presença e por motivos maiores não pude estar ao seu lado. Pelas sábias palavras e também pelo simples fato só de ouvir em alguns momentos. Mãe, você não faz ideia da tamanha importância que você exerce sobre minha vida. TE AMO INCONDICIONALMENTE!!!

Agradeço a minha vizinha Maria Antônia e a minha tia/madrinha Márcia Oliveira, por estarem sempre presentes na minha vida, mesmo não estando de corpo presente em alguns momentos, mas sempre em pensamentos, tentando me transmitir suas energias positivas e suas bênçãos através de suas orações. Agradeço aos meus queridos irmãos, Fernando Oliveira e Marcos Antônio, pela alegria de ter vocês em minha vida e todo suporte que vocês sempre me deram, e também ao meu pequenino sobrinho Davi Oliveira por alegrar os meus dias com esse sorrisinho sapeca e esse coraçãozinho tão puro, capaz de me fazer esquecer todos os problemas do dia a dia. AMO TODOS VOCÊS!!!

Jamais poderia deixar de agradecer a duas amigas especiais, Fabiana Mendes e Luciane Esmerine, as duas irmãs que Deus me deu. Vocês sabem, meninas, o quanto são importantes pra mim. Vocês estiveram comigo em todos, mas em todos os momentos da minha vida, principalmente nesses três anos em que estive ausente. Obrigada pelos conselhos, pelas risadas, pelos segredos guardados, pelo amor, atenção, carinho, preocupação... Enfim, obrigada por essa amizade tão sincera e tão desprovida de interesses. Vocês duas são a prova viva de que existe amizade verdadeira. AMO, AMO, AMO...

Agradeço muito a vocês meninos, Júlio César e Jurandy Penitente, vocês foram fundamentais para a realização desse estudo. Foram amigos, parceiros, em alguns momentos até psicólogos (risos). Obrigada por tudo! Vocês são amigos que irei carregar

prá sempre no coração. É muito bom saber que posso contar com vocês. Adoro!!!!!!!!!!!!

Agradeço ao professor Laércio pela orientação, por ter me recebido de braços abertos, por ter sido tão solícito sempre, por ter me passado todo seu conhecimento como orientador e por ter acreditado que as coisas dariam certo, mesmo quando em alguns momentos a realização desse estudo parecia estar tão longe do nosso alcance. Você foi mais do que um orientador, foi um grande amigo sempre. Adoro você!!!

Agradeço ao Hugo, por toda paciência, compreensão e ajuda sempre que lhe foram solicitadas. Às minhas três grandes amigas de Viçosa, Ana Clara, Luciana Bezerra e Vívian Mendes, pela amizade, pelos conselhos (néh Aninha? risos), pela companhia, pelo ombro amigo sempre que precisei, pelos momentos de lazer e diversão que passamos juntas. Amo todos vocês!!!

Agradeço aos meus amigos de Viçosa: Breno Camilo, Corina, Diego Senra, Rafaella Paola, Carlos Thiago, Fabrício Martins, Bruna Waddington, Camila Silveira. Agradeço também a Lina Carazo, Fernanda Souza e a Priscilla Ramos, pela ajuda durante o experimento e aos meus colegas do Setor de Reprodução.

Agradeço aos meus coorientadores, os professores Eduardo Paulino e José Domingos, por toda a orientação, por estarem sempre dispostos a sanarem minhas dúvidas. Agradeço à Rosi, por toda atenção e paciência, e também a todos os funcionários do Departamento de Veterinária que contribuíram para a conclusão do meu experimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VIII
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO LITERATURA	2
2.1. Estrutura do espermatozoide	2
2.2. Composição da membrana plasmática do espermatozoide	3
2.3. Criopreservação de sêmen caprino	6
2.4. Capacitação espermática e reação acrossômica	7
2.5. Crioprotetores	8
2.6. Diluentes	9
2.7. Tempo de equilíbrio	10
2.8.Características físicas do sêmen	11
2.8.1. Volume	11
2.8.2. Coloração	11
2.8.3. Aspecto	12
2.8.4. Turbilhonamento	12
2.8.5. Motilidade.....	12
2.8.6. Vigor.....	12
2.8.7. Teste de termorresistência (TTR).....	122
2.8.8. Teste hiposmótico (HOST).....	13
2.8.9. Sondas fluorescentes	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Normas de conduta para uso de animais na pesquisa.....	15
3.2. Coleta do sêmen	15
3.3. Análises físicas do sêmen.....	17
3.4. Tratamentos	18
3.5. Diluição, resfriamento, congelamento e descongelamento do sêmen.....	18
3.6. Morfologia espermática do sêmen descongelado (Análise morfológico)	19
3.7. Testes de termorresistência (TTR).....	19
3.8. Sondas fluorescentes.....	20
3.9. Teste hiposmótico (HOST).....	20
3.10. Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Sêmen fresco.....	21
4.2. Sêmen descongelado	23
5. CONCLUSÃO.....	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

OLIVEIRA, Giselle Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Efeito de diferentes tempos de resfriamento pré-congelamento na viabilidade espermática do sêmen descongelado de caprino.** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Coorientadores: Eduardo Paulino da Costa e José Domingos Guimarães.

O experimento foi realizado no Setor de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária da UFV, Viçosa-MG. O objetivo do estudo foi desenvolver uma técnica de criopreservação visando melhorar a viabilidade do sêmen de caprino após descongelamento. Foram utilizados 4 tratamentos: T1, tempo de resfriamento de 1 h; T2, tempo de resfriamento de 2 h; T3, tempo de resfriamento de 4 h; e T4, com tempo de resfriamento de 6 h antes do congelamento. O sêmen foi coletado de quatro caprinos adultos com três anos idade, realizando-se cinco coletas/animal, utilizando um macho adulto como manequim e método de vagina artificial, com as coletas sendo realizadas durante a estação de monta natural (abril e maio de 2012). Foram avaliadas as características físicas do sêmen imediatamente após a coleta e após o descongelamento. Após o descongelamento, foram realizados também quatro testes complementares: termorresistência (TTR), hiposmótico (HOST), de integridade de membrana (INT), e morfológico. Os valores médios obtidos para o sêmen fresco quanto a volume (mL), motilidade espermática progressiva (%), vigor espermático (0-5) e concentração espermática ($\times 10^9$ totais), se encontraram dentro dos padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), respectivamente de 1,5; 85%, 3,78; 3,3 bilhões/mL. A motilidade espermática pós-descongelamento e o vigor espermático nos tratamentos T2 mot. ($38,0 \pm 3,3$) e vigor ($2,2 \pm 0,1$), T3 mot. ($52,3 \pm 4,7$) vigor ($2,4 \pm 0,1$) e T4 mot. ($47,0 \pm 5,0$) e vigor ($2,4 \pm 0,1$), também se mostraram nos padrões recomendados pelo CBRA (1998). Foi observado que o sêmen teve resistência até o tempo de 180 minutos em todos os tratamentos ao longo do TTR. Porém, as amostras de sêmen nos tratamentos 3 e 4 foram os que obtiveram melhores resultados. Foi realizada análise de regressão para reforçar os resultados do tempo zero do TTR, onde se observou uma curva maior no tempo de 265 minutos de resfriamento, ou seja, por volta de 4hs e 25 minutos. Os valores médios dos parâmetros seminais analisados nos testes complementares (HOST, morfológico e INT) realizados no presente estudo se mostraram diferentes ($P < 0,05$) entre os tratamentos somente no teste INT ($29,7 \pm 3,3$; $39,8 \pm 4,6$; $50,0 \pm 5,1$ e $56,5 \pm 4,1$). Foi observada correlação positiva entre motilidade e vigor espermático, e entre motilidade e teste INT. Conclui-se que o tempo de

resfriamento do sêmen de caprino em tempos de 4 e 6 h promoveu melhor viabilidade da célula espermática após o descongelamento do sêmen, aumentando a longevidade do espermatozoide.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Giselle Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, april, 2013. **Effect of different cooling times pre-frozen on the sperm viability of the thawed goat semen.**

Adviser: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisers: Eduardo Paulino da Costa and José Domingos Guimarães.

The experiment was conducted at the Animal Reproduction Section of Veterinary Department, UFV, Viçosa, MG. The aim of the study was develop a technique of cryopreservation in order to improve the viability of goat semen after thawing. Were used four treatments: T1, cooling time of 1 h; T2, cooling time of 2 h; T3, cooling time of 4 h; and T4, with cooling time of 6 h before freezing. The semen was collected from four adult goats with three years old, totaling five collections using as dummy an adult male and the artificial vagina method, with the collections being conducted during the natural breeding season (April and May 2012). Were evaluated physical characteristics of semen immediately after collection and after thawing. After thawing, were also performed four complementary tests: heat resistance (TTR), hyposmotic (HOST), membrane integrity (INT), and morphological. The average values obtained for the fresh semen as the volume (mL), motility (%), sperm vigor (0-5) and sperm concentration ($\times 10^9$ total) were within the standards set by the Brazilian College of Animal Reproduction (1998), 1,5; 85%, 3,78; 3,3 billion / ml, respectively. The post-thaw sperm motility and sperm vigor in the T2 showed mot. (38.0 ± 3.3) and vigor (2.2 ± 0.1), T3 mot. (52.3 ± 4.7) vigor (2.4 ± 0.1) and T4 mot. (47.0 ± 5.0) and vigor (2.4 ± 0.1), also proved within the values recommended by CBRA (1998). It was observed that the semen had resistance until the time 180 minutes in all treatments throughout the TTR. However, semen samples in treatments 3 and 4 were the ones that obtained better results. Regression analysis was performed to strengthen the results of the TTR time zero, where a greater curve was observed on time 265 minutes cooling, in other words, around 4 h and 25 minutes. The complementary tests (HOST, morphological and INT) performed in this study with different cooling times showed differences ($P < 0.05$) between treatments only in INT test ($29,7 \pm 3,3$; $39,8 \pm 4,6$; $50,0 \pm 5,1$ e $56,5 \pm 4,1$). Positive correlation was observed between motility and sperm vigor, and between motility and

test INT. It is concluded that the cooling time of goat semen in times of 4 and 6 h has promoted better sperm cell viability after thawing of semen, increasing longevity of the spermatozoa.

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura tanto de leite quanto de corte no Brasil tem apresentado resultados positivos, mesmo com seu baixo nível tecnológico, o que a coloca numa posição privilegiada dentro do mercado do agronegócio. A Região Nordeste detém o maior rebanho de caprinos em todo o território nacional (91%) (ANUALPEC, 2011). Isto está respaldado pelo incremento do consumo interno, em demandas de exportação de carne e pele para diversos países, bem como na percepção de oportunidade de negócio que a atividade oferece. Além disso, a procura pela carne caprina tem aumentado, bem como a exigência por um produto de melhor qualidade (Fonseca, 2001).

Quando o sêmen caprino foi congelado pela primeira vez por Smith e Polge (1950), esses autores relataram que a fertilidade do sêmen pós-descongelamento foi muito baixa para ser considerada de valor prático. Desde então, muitas investigações têm sido desenvolvidas sobre a criopreservação do sêmen caprino e em todas as etapas envolvidas no processo (LEBOEUF et al., 2000).

A criopreservação de sêmen desempenha um papel importante na inseminação artificial e na conservação de espécies ameaçadas. Porém, a taxa de sobrevivência de espermatozoides é pequena devido aos danos causados na criopreservação, reduzindo assim a capacidade de fertilização (Watson, 2000). Spallazini (1776) descreveu sobre a resistência dos espermatozoides ao congelamento; no entanto, em 1949, quando os cientistas ingleses Smith e Polge, descobriram os efeitos crioprotetores do glicerol, foi que a criopreservação tornou-se uma biotécnica capaz de manter a viabilidade espermática de forma satisfatória. Pesquisadores, desde então, começaram a desenvolver estudos visando encontrar novos crioprotetores capazes de melhorar os resultados após o processo de congelamento e descongelamento de sêmen.

Durante o período de refrigeração ou criopreservação dos espermatozoides, ocorre uma transição de fase da membrana, os lipídios se agregam em microdomínios que alteram a função da membrana plasmática e criam lacunas entre a membrana plasmática e o gel (AMANN, 1987). Os danos nas células ocorrem devido à formação de cristais de gelo intracelular (Mazur, 1984), e alterações de membrana induzidas por transições de fase podem ocorrer quando as membranas são resfriadas (AMANN e PICKETT, 1987; HAMMERTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; MEDEIROS et al., 2002).

O período de equilíbrio ao qual o sêmen de caprino deve ser submetido antes do congelamento é de no máximo 4 h, visto que períodos maiores de tempo (entre 5 e 6 h) não promoveram melhorias na qualidade do sêmen caprino descongelado (SINHA et al., 1992; DUTTA et al., 1996). Deka e Rao (1986) encontraram menores taxas de alterações de acrossoma nos espermatozoides submetidos a um menor tempo de equilíbrio (1h) quando comparados com o sêmen mantido por períodos maiores (3 e 5hs). Entretanto, Das e Rajkonvar (1993, 1994, 1995 e 1996) observaram que o sêmen que permaneceu por 3h em tempo de equilíbrio mostrou melhores índices de motilidade pós-descongelamento e menos lesões acrossomais, quando comparado ao sêmen que permaneceu por 1 e 6 h.

Devido à variabilidade das informações contidas na literatura especializada, o presente estudo teve como objetivodesenvolver protocolo de criopreservação e verificar a influência do tempo de equilíbrio na manutenção da viabilidade espermática do sêmen caprino após o processo de congelamento-descongelamento.

Os objetivos específicos deste trabalho foram avaliar a influência do tempo de resfriamento pré-congelamento na manutenção da viabilidade espermática após o processo de congelamento-descongelamento do sêmen, e avaliar a qualidade do sêmen por meio da aplicação dos testes de termorresistência, hiposmótico, de sonda de fluorescência e morfológico após descongelamento.

2. REVISÃO LITERATURA

2.1. Estrutura do espermatozoide

Os principais componentes de um espermatozoide são a cabeça e a cauda. A cabeça contém o núcleo, o acrossoma e uma pequena quantidade de citoplasma. O núcleo possui uma cromatina altamente condensada e está recoberto em sua parte anterior pelo acrossoma, que compreende uma vesícula revestida por membrana contendo enzimas hidrolíticas (KNOBIL e NEILL, 2006).

A cauda do espermatozoide é composta pelo colo e pelas peça intermediária, principal e terminal. A região da cauda entre o colo e o *annulus* (estrutura firmemente aderida à membrana plasmática do flagelo) é onde está localizada a peça intermediária, sendo que, nessa região da peça intermediária, juntamente com o comprimento total da cauda, são formados os axonemas. O axonema é composto de nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois filamentos centrais. Na peça

intermediária, o padrão 9+2 pares de microtúbulos está circundado por nove densas fibras. O axonema e as fibras associadas são recobertos periféricamente por numerosas mitocôndrias. Esta bainha mitocondrial fornece a energia para a motilidade espermática (HAFEZ e HAFEZ, 2004). As mitocôndrias do espermatozoide são fisiologicamente ativos e podem por meio do processo aeróbico oxidar vários substratos para sintetizar ATP (AITKEN, 2000). Após a fecundação do oócito, a cauda do espermatozoide, região onde se encontram as mitocôndrias, é degradada, evitando herança do DNA mitocondrial paterno à progênie (CUMMINS, 2000).

A peça principal, que se estende do *annulus* até a parte terminal da cauda, é composta centralmente pelo axonema e sua associação de fibras densas. A peça terminal contém apenas o axonema central que está recoberto pela membrana plasmática. O axonema é responsável pela motilidade espermática, os seus pares de microtúbulos de padrão 9+2, geram as ondas da cauda por meio de deslizamento entre os pares adjacentes (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

2.2. Composição da membrana plasmática do espermatozoide

A membrana plasmática biológica é basicamente organizada em sua estrutura por uma bicamada de lipídeos associadas a proteínas (COOPER, 1996), sendo que, os fosfolipídios (colina, serina, glicerol e inositol), glicolipídios e o colesterol são os principais lipídios existentes na mesma. Os fosfolipídios constituem 50% das membranas plasmáticas, sendo responsáveis por aproximadamente 60 a 70% dos lipídeos totais de um ejaculado (WATSON, 1981). Os glicolipídios são encontrados exclusivamente no folheto externo da membrana plasmática, constituindo cerca de 2% dos lipídios totais da membrana; entretanto, o colesterol, assim como os fosfolipídios, encontram-se presentes em grande quantidade na membrana plasmática (COOPER, 1996).

As proteínas são responsáveis por intermediar e realizar funções específicas das membranas plasmáticas, sendo que, grande parte dessas proteínas está envolvida na preservação do DNA e outras com as enzimas do acrossoma, elementos da funcionalidade da membrana (transporte de íons e carboidratos) e receptores de membrana plasmática (COOPER, 1996).

A membrana plasmática do espermatozoide exerce um papel importante na célula espermática, devido seu comportamento durante os processos de capacitação, reação acrossômica e fusão com o oócito (CUASNICU et al., 2001).

A membrana plasmática do espermatozoide é bem semelhante ao modelo de outras membranas plasmáticas em geral (WATSON, 1995), porém, em mamíferos apresenta-se organizada em domínios regionais bem delineados que diferem em composição e função (WOLFE et al., 1998).

A membrana plasmática da cabeça do espermatozoide é subdividida em três segmentos, os quais envolvem o acrossoma, a região intermediária e a região pós-acrossômica, possuindo maior domínio nas regiões acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal a membrana pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial, sendo que os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal. Observa-se no flagelo, o domínio da peça intermediária, que envolve toda a bainha mitocondrial, e o domínio da cauda posterior, que envolve as peças principal e terminal da cauda (EDDY e O'BRIEN, 1994). No entanto, a membrana plasmática da cabeça do espermatozoide é separada da membrana plasmática da peça intermediária por meio do anel posterior, e a membrana da peça intermediária é separada da membrana do flagelo por meio do anel anular. Estes diferentes domínios contém concentrações variadas e distribuições de partículas intramembranas (FLESCHE e GADELLA, 2000).

O espermatozoide está envolto externamente pela membrana plasmática, sendo esta composta por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios dispostos em mosaico fluído (SINGER e NICHOLSON, 1972). Sua composição, tipo de fosfolipídios e quantidade de proteínas são variáveis e influenciam a sensibilidade ao choque térmico. Os lipídeos são os principais constituintes responsáveis pela fluidez da membrana plasmática, fluidez esta que depende não só da composição, mas também da temperatura. Assim, a mudança de estado líquido para gel nas membranas com maior proporção de lipídios de cadeia insaturada ocorre em temperaturas mais baixas (AMANN e GRAHAM, 1993). O alto conteúdo de ácidos graxos insaturados no espermatozoide tende a aumentar o estresse oxidativo (KODAMA et al., 1996).

Existem vários tipos de fosfolipídios, cujo, cada um tem sua preferência específica dentro da bicamada, assimetria de fosfolipídios, no entanto, a quantidade e o tipo de fosfolipídios de membrana mudam de acordo com a espécie animal. Assim, tudo isso pode estar relacionado à maior ou menor estabilidade da membrana celular (HAMMERSTEDT e GRAHAM, 1990).

A assimetria da bicamada é importante para a função celular. Nas hemácias, esta assimetria se deve à polaridade dos fosfolipídios de membrana que estão concentrados, em grande parte, na camada interna, devido a ação da enzima aminofosfolipidetranslocase (VERHOVEN et al., 1992). Os fosfolipídios, cujas cadeias de ácidos graxos são predominantemente poliinsaturadas, quando submetidos à redução da temperatura assumem uma forma cônica denominada “hexagonal II” ou micela invertida, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas.

A membrana plasmática apresenta-se em um estado de fluidez, sendo esta característica fundamental para exercer suas funções. A fluidez da membrana é afetada principalmente pela composição dos fosfolipídios e o pelo colesterol e também pela temperatura que esta membrana é exposta. A temperatura ambiente, os lipídeos e as proteínas de membrana permanecem em estado de fluidez, porém a contínua queda de temperatura pode levar a alterações físicas da membrana, que passa do estado líquido para o gel, sendo que, as cadeias de ácidos graxos que se encontravam distribuídas aleatoriamente se encontram paralelamente, produzindo uma estrutura rígida e tornando essas regiões frágeis e propícias a rupturas e a fusões, e também a permeações de íons (HAMMERSTEDT et al., 1990).

Para muitos lipídios, quando a membrana está em transição da fase fluida para a fase cristalina, a formação dessa micela invertida é transitória; todavia, para certos fosfolipídios, esta estrutura persiste, tornando-se irreversível e impossibilitando a reestruturação do arranjo bilaminar da membrana, mesmo após o aquecimento do espermatozoide à temperatura ambiente (AMANN e PICKETT, 1987). Como resultado, ocorre o aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, ocasionando a desestabilização da membrana, levando a danos irreversíveis (PARKS e GRAHAM, 1992; WATSON, 1995; BEYGI e ZARGHAMI, 2007).

É sabido que os principais danos sofridos pela célula espermática ocorrem durante o processo de congelamento e descongelamento, sendo assim, uma taxa de resfriamento adequada e a adição de diluentes são necessárias para prevenir danos causados à membrana espermática, devido o choque térmico.

2.3. Criopreservação de sêmen caprino

A criopreservação de sêmen permite que o mesmo mantenha sua viabilidade por um período indeterminado em temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ em nitrogênio líquido. A essa temperatura, as reações químicas, processos biológicos e físicos intracelulares e extracelulares são interrompidos; entretanto, durante esse processo, podem ocorrer várias alterações espermáticas e grande perda da viabilidade de espermatozoides durante o período de resfriamento, congelamento e descongelamento do sêmen (PARKS e GRAHAM, 1992).

Inicialmente a célula espermática passa por um período de estresse quando sai de uma temperatura corporal (37°C), caindo pra 5°C . Isto leva a célula espermática a passar por danos estruturais, bioquímicos e biofísicos irreversíveis, fenômenos esses conhecidos como choque térmico (SQUIRES *et al.*, 1999). Dentre esses danos podem ser observadas 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. Com a formação dos cristais de gelo, ocorre um aumento na temperatura, que é necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozoide, podendo esse fato ser minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento (SQUIRES, 1999). Por volta de 5°C , a água intracelular e extracelular permanece resfriada e não cristaliza. Entre -5°C e -10°C , começa a formação dos cristais de gelo no meio extracelular que permanece resfriado, ocorre troca de água para manter o equilíbrio osmótico entre o meio extracelular e o intracelular, resultando na desidratação celular. Neste momento, 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 vez que desidratação muito intensa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, podendo levar a um colapso da membrana plasmática do espermatozoide (MEDEIROS, 2002). A ocorrência de desidratação e perda de água é um acontecimento desejável, devido à capacidade de reduzir a formação de grandes canais de gelo intracelular que provocariam danos às estruturas internas e à membrana plasmática (SQUIRES, 1999).

A curva de congelamento adequada promove desidratação progressiva das células espermáticas, sendo as mesmas funcionais no descongelamento. Todavia, como a camada de gelo extracelular descongela lentamente, o soluto das frações de água que não congela fluirá lentamente para dentro da célula, diluindo o soluto intracelular até atingir a concentração inicial. Entretanto, se o espermatozoide é descongelado rapidamente, o gelo contido no exterior da célula derrete, diluindo o soluto do meio e a água entrará na célula espermática, por osmose, o qual se encontra altamente concentrado, ocasionando danos ao espermatozoide (GRAHAM, 1996).

2.4. Capacitação espermática e reação acrossômica

A capacitação espermática é um evento progressivo e indispensável para a fertilização, que ocorre durante o trânsito dos espermatozoides pelos órgãos genitais femininos. A capacitação espermática pode ser acompanhada minuciosamente durante a incubação *in vitro*, permitindo, assim, estudos detalhados dos mecanismos envolvidos no processo. Os espermatozoides capacitados *in vitro* são dotados de habilidades como a penetração nas camadas do *cumulus oophorus* e a ligação à zona pelúcida (RODRIGUES-MARTINEZ, 2003). O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , HCO_3^- e peróxido de hidrogênio, que juntos são responsáveis pela ativação e produção de AMP cíclico6 (cAMPz) por meio do sistema adenilciclase, consiste na primeira etapa da capacitação.

A reação acrossomal é um processo irreversível, que leva à liberação de enzimas hidrolíticas, possibilitando o espermatozoide penetrar na zona pelúcida. O processo consiste em fusões da membrana do acrossoma com a membrana espermática, bem como a liberação do conteúdo acrossomal. *In vivo*, a reação acrossomal é sequencial e funcionalmente ligada à capacitação, sendo essa reação induzida através do contato do espermatozoide com a zona pelúcida. Além disso, a ligação do espermatozoide à zona pelúcida estimula proteínas G, aumentando assim o pH citosólico e dando início à despolarização da membrana plasmática, que resulta na abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes e na liberação de Ca^{2+} dos compartimentos intracelulares. Consequentemente, ocorre o aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+} que leva a fosforilação de proteínas e, por fim, resulta na reação acrossomal (WITTE e SCHÄFER-SOMI, 2007).

A criopreservação de sêmen em mamíferos é um processo complexo que envolve o balanceamento de muitos fatores. Para que haja sucesso, não apenas o

diluyente, a taxa de diluição do sêmen a taxa de resfriamento e a taxa de congelamento corretos são essenciais, mas também um grande conhecimento da fisiologia espermática das espécies contribui para aumentar a recuperação pós-descongelamento dos espermatozoides e, conseqüentemente, da fertilidade.

O sêmen de caprino é um excelente exemplo, visto que, mesmo havendo muitas semelhanças com o sêmen de outras espécies, o mesmo exige uma atenção especial para aumentar sua viabilidade pós-descongelamento. Como exemplo, podemos citar a interação deletéria entre a gema de ovo e as secreções da glândula bulbouretral existentes no sêmen caprino, fato esse que não ocorre em outras espécies como o touro, javali ou carneiro (PURDY, 2004).

Alguns trabalhos têm relatado que a lavagem do sêmen é um processo que pode danificar as células se realizado incorretamente, mas pode ser benéfico se realizado de forma correta. Os benefícios da remoção do plasma seminal variam. Algumas pesquisas indicam que a remoção do plasma seminal é necessária para aumentar a motilidade pós-descongelamento e a integridade acrossomal no sêmen caprino (DROBNIS et al., 1980; MEMON et al., 1985), enquanto outros trabalhos mostram resultados positivos para o sêmen congelado sem a remoção do plasma seminal (AZERÊDO et al., 2001).

2.5. Crioprotetores

Os crioprotetores são fundamentais para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de criopreservação. A utilização de diversos crioprotetores e suas combinações pode minimizar e controlar os efeitos deletérios na célula durante os processos de congelamento e descongelamento (MELO, 1999).

O glicerol, crioprotetor celular, é largamente utilizado para o congelamento do sêmen caprino, cuja concentração usada em diferentes estudos varia de 3 a 9% (SILVA et al., 2006) com melhores resultados entre 4 e 7% do diluyente TRIS (LEBOEUF et al., 2000). O glicerol é o crioprotetor penetrante mais utilizado nas células espermáticas de caprinos, no entanto, exerce ação tanto intracelular como extracelular (SQUIRES et al., 1999).

O glicerol tem a função de aumentar o volume de canais de solventes descongelados e diluir as altas concentrações de sais durante o processo de resfriamento (SQUIRES et al., 2004). O seu efeito proteor é atribuído a sua propriedade ligação com a água (SALOMON e MAXWELL, 1995). Apesar disso, a presença do glicerol está relacionada com a queda da fertilidade do sêmen congelado nos equinos devido ao seu

efeito tóxico causado por suas altas concentrações no diluente, levando a desnaturação de proteínas da membrana plasmática (SQUIRES et al., 2004).

As amidas têm demonstrado bom potencial como agentes crioprotetores, provavelmente por sua menor toxicidade e por apresentar menor peso molecular (AMANN e PICKETT, 1987; MEDEIROS et al., 2002). Entretanto, segundo Silva et al. (2006), a utilização da dimetilformamida como crioprotetor isolado ou associado ao glicerol, em comparação à utilização única de glicerol, não foi superior na manutenção da qualidade espermática após a criopreservação. Bittencourt et al. (2005) mostraram que a utilização do etilenoglicol como crioprotetor, associado ou não ao EDTA, foi mais eficaz em promover a manutenção da integridade morfofuncional da membrana dos espermatozoides caprinos criopreservados, em comparação ao glicerol e ao glicerol+EDTA.

2.6. Diluentes

O diluente é importante na criopreservação de sêmen, pois supre os espermatozoides por meio de sua fonte de energia, protege as células em situações de choque térmico e cria um ambiente favorável para que os espermatozoides sobrevivam.

Os meios para a criopreservação do sêmen caprino incluem um crioprotetor não penetrante extracelular (leite ou gema de ovo, um crioprotetor penetrante intracelular (glicerol, etilenoglicol ou dimetilsufóxido), um tampão ex: (TRIS), açúcares ex: (glicose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), sais ex: (citrato de sódio ou ácido cítrico) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina) (PURDY, 2004). Vários tipos de diluentes já foram testados na criopreservação do sêmen caprino com resultados variáveis. Azeredo et al. (2001) analisando a integridade da membrana plasmática de espermatozoides caprinos descongelados com e sem plasma seminal, utilizaram TRIS (TRIS 4,039%, ácido cítrico 2,316%, gema de ovo 2,6%, glicerol 5,3%, penicilina 100.000 UI e estreptomicina 1mg/mL de diluente) como diluente base. Os diluentes mais utilizados na criopreservação de sêmen caprino contêm gema de ovo ou leite desnatado. O contato entre o plasma seminal e a gema de ovo pode causar danos ao espermatozoide (ROY, 1957). Nunes et al. (1982) chegaram à mesma conclusão utilizando leite. Roy (1957) observou que os espermatozoides mantiveram sua motilidade em diluentes com gema de ovo com plasma seminal removido, mas se o sêmen com o plasma fosse adicionado ao meio com gema de ovo, o mesmo coagulava e os espermatozoides não resistiriam. Concluíram, então, que a gema de ovo coagulava

devido a uma enzima de origem bulbouretral, denominada enzima coagulante da gema de ovo (EYCE).

Machado e Simplicio (1995) observaram que a presença de fosfatidilcolinas e lipoproteínas na gema do ovo, e caseína no leite, protegem os espermatozoides por minimizar o choque térmico. Devido a isso, tanto a gema de ovo quanto o leite são base para a maioria dos diluentes utilizados.

Existe também uma proteína encontrada na glândula bulbouretral caprina (SBUIII), que é responsável por diminuir a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides caprinos congelados com diluentes a base de leite (LEBOEUFET et al., 2000). É bem possível que a EYCE e a SBUIII sejam a mesma proteína (LEBOEUF et al., 2000). A melhor forma de eliminar essas interações prejudiciais entre o plasma seminal e a gema de ovo ou leite, é separar o plasma do espermatozoide por meio de centrifugação (PURDY, 2004).

2.7. Tempo de equilíbrio

O tempo de equilíbrio é o período em que o sêmen permanece em uma temperatura de 5°C, sendo que, isso ocorre durante seu processo de resfriamento. Esta temperatura deve ser mantida rigorosamente, pois temperaturas acima de 5°C são insuficientes para diminuir a motilidade espermática e o metabolismo, e temperaturas abaixo de 0°C são letais para os espermatozoides (EVANS e MAXWELL, 1990). Durante o período de equilíbrio e resfriamento do sêmen ocorre o equilíbrio osmótico entre os meios extra e intracelulares, e interação das células espermáticas com os constituintes do diluente, adquirindo resistência aos danos causados pela criopreservação (BOUCHARD *et al.*, 1990; ENGLAND, 1993). Dessa forma, com a otimização dos processos iniciais de pré-congelamento, pode-se aumentar os índices de viabilidade espermática pós-descongelamento.

Segundo Oettlé (1986) um período apropriado de equilíbrio, assim como taxas de diluição adequadas e resfriamento celular, são fatores fundamentais para a prevenção do surgimento de alterações patológicas durante o processo de criopreservação espermática.

Os períodos de equilíbrio indicados para criopreservar o sêmen caprino são diversos, mas segundo Deka e Rao (1986) essas diferenças podem ser devido às variadas composições dos meios de congelamento utilizados.

Ritar e Salomon (1983); Simplicio e Machado (1989) e Ritar et al. (1990) citam que o período de equilíbrio pode ser uma etapa dispensável no processo de congelamento do sêmen caprino. No entanto, alguns autores têm demonstrado a importância do tempo de equilíbrio para o aumento da viabilidade do sêmen caprino descongelado. Westhuysen (1978) verificou percentuais de 1 a 2% de células com motilidade pós-descongelamento quando não foi utilizado o tempo de equilíbrio, enquanto para o grupo que permaneceu por 2h em equilíbrio a 5°C, a motilidade espermática variou de 18 a 40%. Salomon e Ritar (1982) citam em seu trabalho que uma metodologia alternativa à criopreservação do sêmen sem a eliminação do plasma seminal, poderia ser feita com uma diluição realizada em uma etapa, seguida do resfriamento por uma 1 a 1,5h, acompanhada, posteriormente, por um tempo de equilíbrio de uma 1,5h em temperatura de 4-5°C antes do congelamento.

2.8. Características físicas do sêmen

2.8.1. Volume

O volume do ejaculado de caprinos varia de 0,5 a 2 mL (MIES FILHO, 1987; HAFEZ, 2004); porém, vários fatores, como o método de coleta do sêmen, a raça, o fotoperíodo, o número de coletas e o tempo de excitação do macho, influenciam na qualidade do sêmen (PAULA et al., 2008). Coletas realizadas pelo método de eletroejaculação resultam em uma amostra de ejaculado com maior volume de secreções pelas glândulas anexas devido à sua alta estimulação, resultando em maior quantidade de plasma seminal. Entretanto, o método da vagina artificial permite que seja liberado volume seminal similar ao observado naturalmente (CBRA, 1998) e, assim, a diluição do sêmen não será aumentada.

2.8.2. Coloração

A coloração do sêmen caprino varia de acordo com a concentração espermática e a presença de plasma seminal; porém, normalmente essa tende a ser amarelada devido à quantidade de lecitina presente no mesmo. No entanto, quanto mais branco for o ejaculado, maior será a concentração espermática (HAFEZ, 2004). Deve-se atentar para as colorações anormais que podem ser avermelhada ou marrom, indicando a presença de sangue vivo ou hemolisado, respectivamente; cinza ou esverdeada, indicando sujeira

ou infecção; e o amarelo citrino, que é característico da presença de urina no sêmen (presença de odor de urina) (MIES FILHO, 1987; HAFEZ, 2004).

2.8.3. Aspecto

O aspecto é um parâmetro físico de fundamental importância na avaliação do sêmen caprino, pois mostra indiretamente a concentração espermática do ejaculado. Pode ser classificado em cremoso, leitoso, opalescente e aquoso, sendo que o primeiro se deve à maior concentração de células espermáticas (MIES FILHO, 1987).

2.8.4. Turbilhonamento

O turbilhonamento ou movimento de massa é o movimento em forma de ondas observado em uma gota de sêmen *in natura* com o auxílio de microscópio de luz. A interpretação é subjetiva e expressa em uma escala de 0 a 5, onde zero é a ausência de turbilhonamento, não implicando em ausência de motilidade, e 5 o valor máximo dado a um movimento de massa acentuado. O turbilhonamento sofre influência de fatores extrínsecos, como método de coleta e temperatura da amostra (CBRA, 1998).

2.8.5. Motilidade

A motilidade espermática analisada em percentagem (0-100%) de espermatozoides móveis e, da mesma forma que no turbilhonamento, é uma avaliação subjetiva (CBRA, 1998). Para uma avaliação mais precisa, coloca-se uma gota de sêmen pré-diluído sobre uma lâmina a 37-38°C e, logo após, observa-se em microscópio de luz, com aumento de 200x (CBRA, 1998).

2.8.6. Vigor

O vigor é a análise que aborda a velocidade com que os espermatozoides se movimentam (CBRA, 1998). Este parâmetro é classificado de 0 (sem movimento progressivo) a 5 (movimento rápido e progressivo). Para essa análise, coloca-se uma gota de sêmen pré-diluído sobre uma lâmina a 37-38° C e, logo após, observa-se em microscópio de luz, com aumento de 200x (CBRA, 1998).

2.8.7. Teste de termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência é utilizado para avaliar o comportamento (motilidade e vigor) dos espermatozoides quando incubados a 37⁰C, temperatura

semelhante ao órgão reprodutor da fêmea, por tempo determinado e, desta forma, predizer a fertilidade seminal (BARNABE et al., 1981). Este tem se mostrado útil para predizer a longevidade do sêmen caprino pós-descongelamento (SANTOS et al. 2006).

O teste de termorresistência aplicado na avaliação de sêmen congelado constitui-se como uma prova de grande aplicabilidade (ARRUDA et al., 1997), especialmente por sua correlação com fertilidade a campo. Consiste na incubação de uma amostra de sêmen em banho-maria em uma temperatura de 37 °C, por um período de até 3h, avaliando-se, ao longo deste tempo, a motilidade progressiva e o vigor espermático (DIMITROPOULOS, 1967 citado por BORGES, 2003).

O CBRA (1998) preconiza que, no mínimo, para o sêmen descongelado, o vigor seja de 2 e a motilidade 30%, para que a partida de sêmen seja liberada para uso.

2.8.8. Teste hiposmótico (HOST)

A membrana espermática é extremamente importante, devido a sua função de transporte seletivo de moléculas que pode ser observado quando uma célula é exposta a condições hiposmóticas, permitindo, assim, a entrada de água para o meio intracelular até que ocorra o equilíbrio osmótico. Porém, esse processo só ocorre em espermatozoides com membranas integras, ou seja, o influxo de água promove um edema celular e, conseqüentemente, um enrolamento na região da cauda devido esse edema (JEYENDRAN et al., 1984). Diversos testes têm sido empregados na avaliação da estrutura e função da membrana plasmática dos espermatozoides. No entanto, o teste hiposmótico mostra-se uma alternativa de execução e leitura simples. Trata-se de uma avaliação funcional da membrana plasmática da célula espermática onde se observa a habilidade da célula diante de situações de estresse osmótico quando a mesma é submetida a soluções de baixa osmolaridade (JEYENDRANET al., 1984), em que os espermatozoides viáveis sofrem um processo de inchaço, com a finalidade de se estabelecer o equilíbrio osmótico, levando ao enrolamento ou dobramento da cauda característico (NEILD et al., 2005).

Jeyendranet al. (1984) descreveram a utilização da técnica para avaliação do espermatozoide humano, testando soluções com osmolaridades que variaram de 50 a 300 mOsmol, obtendo os melhores índices de reação espermática ao teste ao utilizarem soluções a 150 mOsmol/kg ou menos. Em seguida, Fonseca et al. (2001) testaram 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/kg. Os autores observaram que a maior percentagem de espermatozoides reativos ao teste e com um maior grau de reatividade (dobramento de cauda e edema) foi encontrada em solução hiposmótica entre 125 e 150mOsmol/kg. Os mesmos autores utilizaram tempo de incubação de 60 minutos, a 37°C, tempo esse bem superior ao preconizado por Caiza De La Cueva et al. (1997) que citam que o tempo ideal para que ocorram as reações é de 20 a 30 minutos.

Logo após o período de incubação, as amostras do teste hiposmótico podem ser fixadas com solução de formol-salina tamponada para serem avaliadas posteriormente, 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, (MELLO e HENRY, 1997):

$$\text{HO\%} = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HOST}) - (\% \text{ de alterações na região}).$$

2.8.9. Sondas fluorescentes

A membrana plasmática representa importante papel na capacidade fertilizante destas células, modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no órgão genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração no oócito (HOLT, 1995; WATSON, 1995; LENZI et al., 1996).

Dessa forma, é importante que esta estrutura se apresente íntegra tanto estruturalmente quanto funcionalmente, permitindo, assim, que a célula tenha viabilidade e capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAN, 1992). Para avaliar esta integridade, alguns testes laboratoriais podem ser realizados, e dentre eles, protocolos empregando sondas fluorescentes.

A técnica que utiliza sondas fluorescentes tem sido usada cada vez mais devido à sua capacidade de marcar estruturas específicas das células, detectar integridade estrutural (CELEGHINI, 2005), e também de possibilitar a avaliação de vários compartimentos celulares ao mesmo tempo (CELEGHINI et al., 2008).

Corantes para microscopia de luz têm sido preconizados na análise morfológica de células espermáticas (WAY et al., 1995). A utilização de sondas de diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo foi descrita por Gardner et al.(1986) e Soderquist et al.(1997), com objetivo de visualizar a integridade da membrana

plasmática de espermatozoides bovinos. Posteriormente, Harrison e Vickers (1990) repetiram sua aplicação para espermatozoides de ovinos e suínos. O diacetato de carboxifluoresceína é um éster não polar, não fluorescente e permeável na membrana plasmática. Dentro da célula, é hidrolisado por esterases inespecíficas, resultando em um composto fluorescente e impermeável à membrana plasmática intacta que fluoresce verde. Por outro lado, o iodeto de propídeo, que se liga e cora DNA celular, é impermeável à membrana plasmática; portanto, somente penetra e cora as células lesadas (GARDNER et al., 1986; HARRISON e VICKERS, 1990).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Normas de conduta para uso de animais na pesquisa

Todos os procedimentos realizados seguiram as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFV, sendo aprovados com o protocolo 79/2012, sob responsabilidade do médico veterinário Laércio dos Anjos Benjamin, CRMG-MG 3387.

3.2. Coleta do sêmen

Foram utilizados quatro reprodutores caprinos machos da raça Pardo Alpino, com idade de 3 anos. Foram realizadas cinco coletas de sêmen por animal, intercaladas em 3 dias, com o auxílio de um macho da mesma espécie como manequim (Figura 1) e empregando o método de vagina artificial (temperatura da água entre 40-42°C) (Figura 2). Como revestimento da mucosa da vagina, foram utilizados sacos plásticos em forma de funil, onde na extremidade mais fina foi acoplado um tubo plástico de centrifuga graduado (15 mL), revestido externamente com papel alumínio (Figura 3) para evitar exposição do sêmen à luz solar, a qual possui ação espermicida. Em seguida, o tubo com o sêmen foi encaminhado ao laboratório, para ser analisado e processado. As coletas foram realizadas no período de estação de monta que ocorre no inverno, estendendo-se do início de abril até o final de junho, sempre no período da manhã.

Os animais foram acomodados em baias individuais, no Setor de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária da UFV, sendo alimentados duas vezes ao dia com concentrado protéico (500 g/dia) e feno de Tifton (*Cynodon spp*), além de sal mineral e água *ad libitum*.



Figura 1. Coleta do sêmen empregando um macho como manequim contido em tronco apropriado.



Figura 2. Vagina artificial para coleta de sêmen caprino (Modelo artesanal).



Figura 3. Tubo de ensaio com palhetas acondicionadas no interior da mamadeira contendo metade de seu volume com álcool etílico, durante o processo de resfriamento do sêmen.

3.3. Análises físicas do sêmen

Após a coleta do sêmen, o tubo foi colocado imediatamente dentro do banho-maria (37°C) juntamente com o diluente, sendo todo material utilizado na avaliação do sêmen previamente aquecido em placa aquecedora também regulada para temperatura de 37°C. O volume da amostra foi obtido diretamente do tubo de coleta graduado e medido em mL. O aspecto e a coloração do ejaculado foram verificados visualmente e inferidos valores de acordo com escalas pré-definidas para aspecto (1: aquoso, 2: leitoso, 3: cremoso, 4: opalescente) e coloração (1: branca, 2: branco-amarelada, 3: amarelada).

O turbilhonamento foi avaliado por meio da deposição de uma gota de sêmen (10 µL) em uma lâmina, observando em microscópio de luz em aumento de 100x para posterior classificação em escala de 0 a 5, admitindo-se zero como ausência deste parâmetro, e 5, como o valor máximo de movimento.

Em uma lâmina escavada foram colocados 10 µL do sêmen e 100 µL do diluente que depois de homogeneizados, foi retirada uma alíquota de 10 µL para realizar a avaliação da motilidade e vigor. A observação foi feita em microscópio de luz, em aumento de 200x, utilizando-se lâminas e lamínulas pré-aquecidas.

Para o parâmetro motilidade foram atribuídas notas percentuais subjetivas de 0 a 100% em relação ao percentual de espermatozoides móveis totais, enquanto para o vigor, os valores de 0 a 5 foram atribuídos conforme a intensidade e velocidade de movimentação.

A longevidade do sêmen fresco foi avaliada pelo teste de termorresistência (TTR) que consistiu em colocar uma amostra de 100 µL do sêmen em microtubo de 1,5

mL, adicionando-se posteriormente 200 µL de diluente, e incubando-se a 37°C por período de 180 minutos. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados nos tempos de 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos.

Para realização da avaliação da concentração espermática, uma alíquota de 20 µL do sêmen foi diluída em 2 mL de água, na proporção 1:100. Posteriormente, uma alíquota de 20 µL da mistura sêmen: água foi colocada em uma câmara de Neubauer e o número de células espermáticas foi quantificado.

3.4. Tratamentos

Nesse estudo foram utilizados quatro tempos de resfriamento e equilíbrio: 1 h de resfriamento (T1), 2 h (T2), 4 h (T3) e 6 h de resfriamento (T4).

3.5. Diluição, resfriamento, congelamento e descongelamento do sêmen

Após o exame físico (coloração, aspecto, volume), uma alíquota de 10 µL de sêmen in natura foi colocada em 1 ml de solução formol-salina tamponada proporção 1:100 para determinação da concentração de doses e do volume final do diluente a ser adicionado.

O diluidor utilizado neste experimento foi o Bovimix[®] (Nutricell Nutrientes Celulares Ltda.) a base TRIS Universal [2,2-Bis (hydroxymethyl)-2,2',2''-nitriloethanol; Bis (2-hydroxyethyl) adentes (hydroxymethyl) methane; 2-Bis (2-hydroxyethyl) amino-2-(hydroxymethyl) -1,3-propanediol], contendo gema de ovo, estreptomicina, leite desnatado, penicilina e glicerol, de acordo com o descrito por Gunzel (1979) e apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Composição química do diluente base (BOVIMIX[®]).

Componentes	Quantidade (mL)
TRIS	36,25 mL
Leite desnatado	36,25 mL
Gema de ovo	20 mL
Penicilina	10 UI/mL
Estreptomicina	0,02 mg/mL
Glicerol	7 mL

Realizada a diluição final, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL contendo 50 milhões de espermatozoides. As palhetas foram colocadas em tubos de ensaio de 20 mL revestidas por um refil e colocadas dentro de um recipiente de plástico contendo álcool etílico absoluto. O recipiente foi colocado em um banho-maria com temperatura de 37°C, posicionado verticalmente dentro de geladeira com temperatura interna de 5°C, nos tempos de 1 h (T1,) como descrito por Fürst (2002); 2 h (T2), 4 h (T3) e 6 h (T4).

Após o resfriamento, procedeu-se o congelamento do sêmen na posição horizontal. As palhetas foram dispostas sobre uma grade, 5 cm acima da lâmina de nitrogênio líquido, durante 20 minutos. Sequencialmente, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C para o congelamento final do sêmen. Em seguida, foram armazenadas em canecas dentro do botijão contendo nitrogênio líquido a -196°C, sendo descongeladas depois de trinta dias.

As partidas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos e homogeneizadas para análise imediata da motilidade e vigor espermáticos por meio de microscopia de contraste de fase em aumento de 100x.

3.6. Morfologia espermática do sêmen descongelado (Análise morfológica)

Para a avaliação de danos na morfologia espermática (alterações de cabeça e cauda), foram retiradas alíquotas de 20 µL de cada um dos quatro tratamentos após o descongelamento, e colocadas em tubos contendo 2 mL de formol-salina tamponado, sendo posteriormente avaliadas mediante preparação úmida entre lâmina e lamínula, utilizando-se microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x. Para tanto, foram contadas 100 células espermáticas, computando e classificando individualmente as alterações encontradas, levando em conta defeitos menores e defeitos maiores, segundo Blom (1973).

3.7. Testes de termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência (TTR) consistiu na incubação de uma amostra de sêmen descongelado em banho-maria, na temperatura de 37°C, e incubados por 180 minutos (DIMITROPOULOS, 1967; VOGLER et al., 1991), avaliando-se a motilidade progressiva e o vigor espermático (DIMITROPOULOS, 1967).

3.8. Sondas fluorescentes

Foram utilizados nesse estudo dois fluocromos, o diacetato de carboxifluoresceína e o iodeto de propídeo, segundo a técnica descrita por Harrison e Vickers (1990). Foram avaliados 100 espermatozoides em microscópio de fluorescência, os quais foram classificados como íntegros, quando a cabeça do espermatozoide se encontrava com a coloração verde, e lesados, quando observado uma coloração vermelha.

3.9. Teste hiposmótico (HOST)

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo teste hiposmótico (HOST), utilizando-se solução hiposmótica de 100 mOsmol/kg como preconizado por Fonseca (2001). Para o preparo da solução hiposmótica, foram dissolvidos em 1000 mL de água deionizada, 9 g de frutose e 4,9 g de citratotrisódico (REVELL e MRODE, 1994). Realizou-se o teste hiposmótico do sêmen descongelado para verificar as alterações de membrana ocasionadas pelo processo de congelamento. Adicionou-se, a uma alíquota de 20 µL de sêmen, 1 mL de solução hiposmótica, incubando-a em seguida por meia hora em banho-maria a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL de solução de formol-salina tamponado às amostras para fixação das mesmas. Cada amostra foi montada entre lâmina e lamínula e analisada em microscopia de contraste de fase, em aumento de 1000x, onde foram analisados 100 espermatozoides por amostra. Os espermatozoides foram classificados quanto à presença ou não de cauda enrolada. O percentual de células reativas foi determinado empregando a seguinte fórmula (MELLO e HENRY, 1997):

$HO\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após o HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do HOST}).$

3.10. Análise estatística

No presente estudo não se observou interação entre animal e tratamento. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em ensaio fatorial 4x4 (4 animais x 4 tratamentos). Todas as análises foram realizadas utilizando o *Statistical Analysis System* (SAS, 2002).

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade de variância (Teste de Cochran e Bartlett) usando o PROC UNIVARIATE do *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). Os dados referentes à

motilidade progressiva, defeitos espermáticos (menores, maiores e totais), teste hiposmótico e integridade de membrana quando não atenderam as exigências da ANOVA, foram submetidos à transformação arco-seno ($y' = \arcsen^2\sqrt{y}$), e então submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o PROC UNIVARIATEANOVA (SAS, 2002). Os dados referentes ao vigor espermático para o sêmen descongelado foram analisados pelo teste de Wilcoxon, e para o sêmen fresco pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando o PROC NPAR1WAY (SAS, 2002). As correlações entre as variáveis motilidade progressiva, defeitos espermáticos (menores, maiores e totais), teste hiposmótico e integridade de membrana foram analisadas pelo teste de correlação linear de Pearson, e as relações do vigor espermático com as demais variáveis pela correlação de Spearman. Para melhor entendimento da relação das variáveis motilidade progressiva e integridade de membrana com o tempo de resfriamento, foi realizada análise de regressão utilizando o PROC REG (SAS, 2002). Médias e erros-padrão da média foram analisados por estatística descritiva. O nível de significância adotado foi $\alpha \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sêmen fresco

Não houve interação animal e tratamento em nenhuma das variáveis estudadas ($P > 0.05$).

No presente estudo, a média do volume dos ejaculados foi de 1,5 mL (Tabela 2). Os valores observados se encontram dentro do recomendado pelo CBRA (1998), que é de no mínimo 0,8 mL. Também é citado na literatura que o volume seminal de caprinos varia de 0,2 a 2 mL (NUNES, 2002; HAFEZ, 2004), sendo mais observados volumes entre 0,6 e 1,3 mL para bodes da raça Alpina, fora e dentro da estação reprodutiva, respectivamente (KARATZAS et al., 1997; ROVAY, 2006; SANTOS et al., 2006).

Neste estudo os ejaculados foram classificados quanto ao aspecto conforme Hafez (2004) em aquoso, leitoso e cremoso (Tabela 2).

De acordo com a metodologia utilizada para o parâmetro coloração foi feita a classificação em branca, branco-amarelada e amarelada (Tabela 2). Contudo, a coloração branca não foi observada nas avaliações realizadas nos ejaculados, predominando as cores amarelada e branco-amarelada. Nos caprinos, o sêmen se

apresenta naturalmente mais amarelado e, na maioria das vezes, é devido à presença de plasma seminal em grande quantidade (HAFEZ, 2004).

O aspecto e a coloração do sêmen de ruminantes podem indicar a concentração de espermatozoides no ejaculado (MIES FILHO, 1987; CHEMINEAU et al., 1991; e HAFEZ, 2004). Santos *et al.* (2001) não verificaram variações no aspecto seminal durante cinco meses de avaliação em bodes da raça Saanen, os quais apresentaram sempre cremosos, estando relacionados com uma elevada concentração espermática. Assim, quanto menos aquoso e com coloração branca (menos plasma), maior será a concentração de espermatozoides (HAFEZ, 2004).

A média da motilidade e vigor espermáticos do sêmen fresco obtida neste estudo (Tabela 2) se apresentou acima do valor mínimo preconizado pelo CBRA (1998) para o sêmen caprino a fresco (70% e 3,0, respectivamente). Da mesma forma, Bispo (2005) observou valores de 82,33% e 3,93, enquanto Betini et al. (1998) observaram 86,0% e 3,66, para motilidade e vigor espermático, respectivamente. Esses resultados confirmam que os animais utilizados para esse estudo possuem um bom padrão reprodutivo, além do manejo e cuidados adequados antes e depois da coleta.

Tabela 2. Média±erro-padrão para volume, turbilhonamento, motilidade espermática, vigor espermático e concentração do sêmen fresco de bodes da raça Pardo Alpino.

Parâmetros	Aspecto	Médias
Volume	-	1,5 ± 0,25 mL
Aspecto dos ejaculados	Leitoso	78%
	Cremoso	22%
	Aquoso	0%
Coloração	Amarelada	67,50%
	Branco-amarelada	32,50%
Concentração	-	2,88 ± 0,28 bilhões/mL
Turbilhonamento (0-5)	-	3,6 ± 0,18
Motilidade (0-100%)	-	80,0 ± 3,53%
Vigor (1-5)	-	3,5 ± 0,35

4.2. Sêmen descongelado

O teste de termoresistência (TTR) é utilizado para avaliar o comportamento (motilidade e vigor espermático) dos espermatozoides quando incubados a 38°C por determinado tempo e, desta forma, predizer a fertilidade seminal (BARNABE et al., 1981). Desde que o sêmen descongelado após a inseminação sofra tipos similares de incubação durante o transito pelos órgãos genitais femininos, a sobrevivência dos espermatozoides incubados *in vitro* por longa duração pode predizer a habilidade fertilizante do sêmen.

No presente estudo, os parâmetros do sêmen caprino do tratamento 1 analisado pós-descongelamento no tempo zero do TTR, não atendeu às normas preconizadas pelo CBRA, que é de 30% de motilidade espermática (Tabela 3). Da mesma forma, neste mesmo tratamento e tempo, o vigor espermático apresentou valor abaixo do preconizado pelo CBRA (2,0) (Tabela 4). Porém, Bittencourt (2005) registrou resultado acima do obtido neste trabalho, para motilidade (51%) e vigor espermático (3,0) no tratamento 1 do TTR. Diferenças observadas por Bittencourt (2005) são devidas à variação individual dos animais, a metodologia utilizada nesses estudos, e também quanto ao diluente (o diluidor foi preparado de acordo com Roberts, 1986). Entretanto, o processo de resfriamento, provavelmente pode ter alterado a fluidez da bicamada fosfolipídica devido a um possível choque térmico, fazendo com que fosfolipídios semelhantes juntem-se e retirem proteínas da membrana plasmática, levando a uma diminuição da motilidade da célula espermática (JASKO, 1994). Já os demais tratamentos obtiveram melhores resultados na motilidade (Tabela 3) e vigor espermáticos (Tabela 3) do sêmen descongelado no tempo zero do TTR ($P < 0,05$).

Os melhores resultados na motilidade espermática foram observadas nos tratamentos 3 e 4 em todos os tempos, sendo verificada diferença ($P < 0,05$) destes tratamentos em relação aos demais, a partir de 90 minutos do TTR (Tabela 3). Segundo England (1993), é durante o período de resfriamento e equilíbrio do sêmen que as células espermáticas adquirem resistência aos efeitos do congelamento, permitindo maior interação entre os espermatozoides e os componentes do meio. Assim, pode-se afirmar que nesse estudo quanto mais longo o tempo de resfriamento (4 e 6 hs) e a interação entre o sêmen e os compostos adicionados a ele, melhores os resultados de sobrevivência das células espermáticas.

Das e Rajkonvar (1993, 1994, 1995 e 1996) observaram que o sêmen que permaneceu por 3 h em tempo de equilíbrio mostrou melhores índices de motilidade

espermática pós-descongelamento, quando comparado ao sêmen que permaneceu por 1 ou 6 h.

Sinha et al. (1992) e Dutta et al. (1996) concluíram que o tempo de equilíbrio ideal ao qual o sêmen caprino deve ser submetido antes do congelamento encontra-se entre 1 e 4 h, corroborando com o presente estudo que observou melhora no processo de pós-congelamento através de um tempo de equilíbrio após 4 h.

Na tabela 4 estão apresentados os resultados de vigor espermático do sêmen descongelado durante o teste de termorresistência de 0-3 h, para todos os tratamentos. Pode-se observar que os tempos de resfriamento usados neste estudo (1, 2, 4 e 6 h) apresentaram diferença ($P < 0,05$) dos valores médios nos tratamentos 3 e 4 em relação aos demais somente no tempo 150 minutos de incubação. Estes valores não correspondem ao valor estabelecido pelo CBRA (2,0), para sêmen descongelado. No entanto, em todos os outros tempos não foram verificadas diferenças ($P > 0,05$) entre os valores médios nos tratamentos 2, 3 e 4 (tabela 3).

Tabela 3. Motilidade espermática progressiva (%) do sêmen caprino descongelado e submetido ao teste de termorresistência.

Tratamento	Motilidade espermática pós-descongelamento						
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
T1	16,0±3,4 ^{*b}	8,5±3,4 ^b	4,0±1,5 ^b	3,3±1,6 ^c	2,0±1,4 ^c	1,3±0,9 ^c	0,5±0,3 ^c
T2	38,0±3,3 ^a	33,8±4,1 ^a	28,5±4,3 ^a	22,8±4,3 ^b	19,5±4,4 ^b	12,8±3,7 ^b	10,0±2,9 ^b
T3	52,3±4,7 ^a	46,8±5,2 ^a	41,5±5,0 ^a	37,0±4,9 ^a	36,0±5,8 ^a	30,0±5,5 ^a	24,5±5,1 ^a
T4	47,0±5,0 ^a	41,5±3,8 ^a	40,3±4,5 ^a	32,8±5,1 ^{ab}	30,0±4,9 ^{ab}	27,0±5,0 ^a	24,8±4,7 ^a

^{a,b,c}Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (ANOVA; $P < 0,05$).

* Média ± Erro-padrão da média

Segundo Kumar (2000), tanto o vigor quanto a motilidade espermática progressiva durante o teste de termorresistência (TTR), apresentaram comportamento semelhante, sendo altos nas primeiras horas do teste, diminuindo nas horas intermediárias e, posteriormente, estabilizando em baixos valores nas horas finais do teste. O sendo observado o mesmo comportamento dessas variáveis durante o teste de

TTR no presente estudo. É sabido que esse processo é fundamental para a fertilidade, pois facilita a passagem do sêmen pelo aparelho genital feminino tornando possível a penetração nas células do *cumulus* e na zona pelúcida.

Tabela 4. Vigor espermático do sêmen caprino após o descongelamento ao longo do teste de termorresistência.

Tratamento	Vigor espermático pós-descongelamento						
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
T1	1,2±0,2 ^{*b}	0,7±0,2 ^b	0,3±0,1 ^b	0,3±0,2 ^b	0,2±0,1 ^b	0,2±0,1 ^c	0,1±0,1 ^b
T2	2,2±0,1 ^a	2,1±0,1 ^a	1,8±0,2 ^a	1,4±0,2 ^a	1,4±0,2 ^a	0,9±0,2 ^b	0,8±0,2 ^a
T3	2,4±0,1 ^a	2,2±0,2 ^a	2,1±0,2 ^a	1,9±0,2 ^a	1,9±0,2 ^a	1,5±0,2 ^a	1,4±0,2 ^a
T4	2,4±0,1 ^a	2,3±0,1 ^a	2,2±0,2 ^a	1,9±0,2 ^a	1,7±0,2 ^a	1,5±0,2 ^a	1,4±0,2 ^a

^{a,b,c}Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna diferem entre si (Kruskal wallis; P<0,05).

* Média ± Erro-padrão da média

Foram observadas diferenças (P<0,05) entre o valor médio para espermatozoides com membranas integras no tratamento 1 quando comparado aos valores médios obtidos nos tratamentos 3 e 4; porém, o mesmo não diferiu do valor médio no tratamento 2, que por sua vez diferiu (P<0,05) dos valores médios do tratamento 4 (Tabela 5).

A percentagem de membrana morfológicamente lesada detectados por meio da técnica de sonda de fluorescência, não ultrapassou o limite máximo de 70% nos tratamentos 2, 3 e 4 (Tabela 5). De acordo com Salamone Maxwell (1995), apenas 20-30% das células espermáticas ovinas permanecem íntegras após o descongelamento. Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se observar que a criopreservação do sêmen caprino em tempos de resfriamento mais longos (4 e 6 h) proporcionou melhores resultados de integridade da membrana plasmática do espermatozoide.

Na tabela 5 estão apresentados os valores médios de células espermáticas pós-descongelamento reativas ao teste HOST no presente experimento. Na avaliação do efeito do tempo de equilíbrio sobre a integridade e funcionalidade da membrana

plasmática (MP) não foi verificada diferença ($P>0,05$) entre os quatro tempos de resfriamento utilizados.

Tabela 5. Percentagem de espermatozoides reativos ao teste HOST, INT intactas e das características morfológicas (defeitos menores, defeitos maiores e defeitos totais) do sêmen caprino submetidos a diferentes tempos de resfriamento e posterior congelamento.

Tratamento	INT	HOST	DME	DMA	DEFT
T1 (1h)	29,7 ±3,3* ^c	12,3 ±3,0 ^a	11,6 ±1,9 ^a	7,9 ±2,8 ^a	19,5 ±3,0 ^a
T2 (2h)	39,8 ±4,6 ^{bc}	12,6 ±2,8 ^a	13,4 ±2,1 ^a	5,2 ±1,6 ^a	18,6 ±2,0 ^a
T3 (4h)	50,0 ±5,1 ^{ab}	18,1 ±3,8 ^a	13,4 ±2,2 ^a	6,3 ±2,4 ^a	19,7 ±2,5 ^a
T4 (6h)	56,5 ±4,1 ^a	12,0 ±3,5 ^a	13,3 ±2,1 ^a	7,5 ±2,7 ^a	20,8 ±2,5 ^a

^{a,b,c} Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna diferem ($P<0,05$) pelo teste de Tukey; INT= Integridade de membrana; HOST= teste hiposmótico, DME= defeitos menores; DFM defeitos maiores; DEFT = Defeitos totais.

* Média ± Erro-padrão da média.

Ramos (2012), utilizando o tempo de resfriamento de três horas obteve resultado similar na análise INT (51,3%) aquele observado com seis horas no presente estudo (Tabela 5). Ressalta-se que o presente estudo utilizou o mesmo diluente e a mesma metodologia.

Martins (2009), realizando a análise de INT em sêmen de bovinos, obteve 10,3% de membranas integras em tempo de resfriamento de 5 h, resultado muito abaixo quando comparado com o do presente estudo que em 4 e 6 h de tempo de resfriamento apresentou resultados superiores (50,0) e (56,5). Porém, Borges (2008) verificou um percentual de 41,5% de espermatozoides viáveis na coloração fluorescente, usando a mesma metodologia de Martins (2009).

Câmera et al. (2011), usando tempo de resfriamento de 12 horas em sêmen de ovino, observaram 38,1% de membranas plasmáticas integras no tratamento controle. O tempo de resfriamento utilizado por esses autores melhorou significativamente a preservação da integridade da membrana plasmática em relação ao sêmen fresco. A exposição do sêmen à temperatura de resfriamento (5°C) pode induzir alterações na organização da bicamada lipídica da membrana, particularmente em espécies com concentrações elevadas de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática, como ocorre com espermatozoides de carneiro (HOLT, 2000).

Cavalcante (2003) estudando a fertilidade de machos caprinos das raças Boer e Alpina durante as estações reprodutivas e não reprodutiva, observou porcentagens de 20,33 e 30,01% de membranas íntegras para sêmen pós-descongelamento.

Segundo Brito et al. (2003), o teste de INT tem alta sensibilidade em detectar os danos físicos da membrana plasmática em relação a outros testes; porém, ressalta-se que o mesmo deve ser utilizado junto com o teste HOST, devido à capacidade fecundante de amostras de sêmen não ser precisa com a realização de um único teste, porém quando os métodos são usados em conjunto, aumenta-se a acurácia em prever o potencial de fertilidade do sêmen criopreservado.

Segundo Santos et al. (2001), em seu estudo, os mesmos observaram 28% das membranas reativas para caprinos por meio do teste HOST, diferentemente de Fonseca et al. (2001) que observaram 62,75%, e também por Salgueiro et al. (2003) que verificaram valores máximo de reação de 96 e mínimo de 31%, ambos utilizando 1,5 hora como tempo de resfriamento e a mesma osmolaridade do presente estudo. Porém, os diluentes utilizados nos trabalhos citados acima não foram descritos pelos autores.

Uma porcentagem de células reativas pode permitir o transporte seletivo de moléculas e a sua integridade é importante para que ocorram as reações necessárias à união dos gametas masculino e feminino (JEYENDRAN et al., 1984).

É importante ressaltar que os autores citados (FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003) não descontaram dos valores obtidos de células reativas ao HOST às porcentagens de patologias de cauda usualmente encontradas (antes da incubação para o HOST) tanto no sêmen fresco, quanto principalmente após o processo de criopreservação, que geralmente provoca o surgimento de dobramento de cauda, considerando, assim, todas as alterações de cauda como sendo reativas à incubação em solução hiposmótica. Este fato pode explicar os altos valores de reação ao HOST encontrados nos três estudos citados anteriormente.

Pugliese et al. (2012) usando em seu experimento três diferentes tempos de resfriamento (1, 2 e 3 h) verificaram valor médio de 27,3% de membranas íntegras em todos os tratamentos, não havendo diferença entre os mesmos.

Diferentemente do presente estudo, em bovinos, Leite et al. (2010) reportaram que a utilização de tempos de equilíbrio de 2 ou 4 h aumentaram a porcentagem de espermatozoides com a MP e membrana acrossomal íntegra utilizando-se dois diluentes seminais (TRIS e BIOXCELL). Isto mostra que para bovino, há a necessidade de

tempos de equilíbrios mais longos com estes diluentes para promover estabilização das membranas espermáticas e ação dos crioprotetores.

A avaliação da funcionalidade da membrana plasmática por meio do teste HOST é importante, pois o processo de criopreservação promove danos às membranas plasmáticas dos espermatozoides alterando seus domínios e as funções de várias proteínas (proteínas transportadoras de íons, por exemplo) importantes no metabolismo espermático. As mudanças de temperatura, estresse osmótico e toxicidade devido ao uso dos crioprotetores (por exemplo, o glicerol), formação e dissolução dos cristais no ambiente extracelular, são as principais causas de injúrias subletais e letais aos espermatozoides (WATSON, 2000). Na figura 4 pode se observar uma célula espermática com a membrana íntegra e outra lesionada.

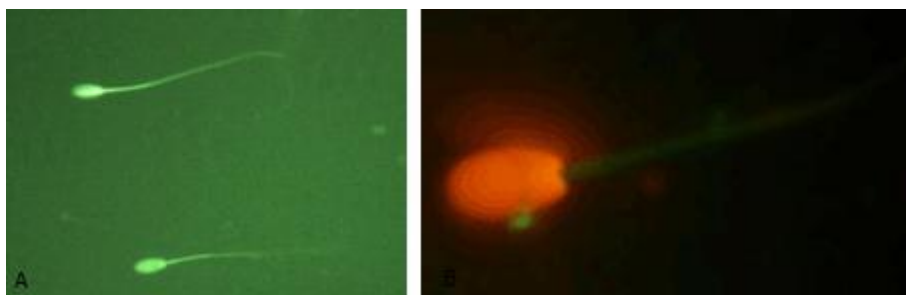


Figura 4. A- membrana íntegra, B- membrana lesada.

As características morfológicas do sêmen descongelado não apresentaram diferenças ($P>0,05$) entre os quatro tratamentos utilizados neste experimento (Tabela 5). Porém, em todos tratamentos os valores médios de defeitos menores mostraram-se acima do valor preconizado pelo CBRA (1998), que não deve ultrapassar 10% de defeitos maiores e 20% de defeitos totais para a espécie caprina. Verificou-se nesse estudo grande frequência de caudas dobradas, caudas enroladas, caudas fortemente dobradas e cabeça isolada normal. Segundo Mies Filho (1987) e Stromet al.(1993) essas alterações podem ser devido ao processamento do sêmen (choque térmico) e, ou sua criopreservação. Porém, no presente estudo não foi realizada a análise morfológica do sêmen fresco, impossibilitando confirmar que essas alterações ocorreram durante o processamento do sêmen.

Bittencourt et al. (2006) relataram que o sêmen caprino submetido a 1, 2, 3 e 4 horas de resfriamento pré-congelamento, apresentaram 11,70; 08,10; 11,70 e 08,10% de defeitos totais. Entretanto, estes autores relatam que os melhores resultados foram observados nos tempos de 1 e 2 h de resfriamento, pois nos tempos superiores

ocorreram maiores índices de lesões acrossomais. Os mesmos autores concluíram que tempos superiores a estes são desnecessários e podem influenciar negativamente a viabilidade espermática pós-descongelamento.

Em relação aos defeitos maiores, uma das patologias espermáticas de maior importância encontra-se no acrossoma, sendo esta uma das estruturas mais importantes e susceptíveis aos danos e alterações provocados durante o processo de congelamento (GARNER et al., 1986).

Das e Rajkonvar (1994 e 1996) obtiveram baixos índices de lesões acrossomais utilizando 3h de tempo de resfriamento, em relação ao sêmen congelado após 1h de resfriamento. Essas observações diferem dos resultados obtidos no presente estudo, em que não foi verificada diferença para o percentual de defeitos maiores entre os tempos estudados ($P>0,05$).

Não houve correlação positiva entre a motilidade espermática analisada no teste de TTR e as análises morfológicas do sêmen. O mesmo aconteceu com a análise morfológica em relação à INT; entretanto, quando correlacionados os defeitos menores com os defeitos totais observou-se uma correlação média e positiva (0,49). Porém, quando foram correlacionados os defeitos menores com o teste HOST se observou uma correlação negativa, porém baixa (-0,43), o que vem confirmar que quanto mais patologias o sêmen apresentar maior será a porcentagem de membranas lesadas. Já na correlação entre os defeitos totais e o HOST foi observada correlação negativa. Entretanto, Vidigal (2008) trabalhando com caprinos, Neild et al. (1999) trabalhando com sêmen de equino, e Vasquez et al. (1997) trabalhando com sêmen de suíno, verificaram correlação positiva entre o teste HOST e a INT.

As correlações da motilidade espermática com teste hiposmótico de forma geral não mantiveram um padrão de comportamento; dessa forma, não é possível afirmar que a motilidade espermática progressiva seja um bom parâmetro para determinar a integridade funcional da membrana espermática. Segundo (LIN et al., 1998), as lesões da membrana podem não estar associadas à perda da motilidade espermática. Isto devido à motilidade dos espermatozoides não dependerem exclusivamente do transporte de elementos através da membrana, mas também de outros fatores bioquímicos (MOHANACHANDRAN NAIR et al., 1998).

Observou-se que o parâmetro motilidade espermática parece não ser isoladamente eficaz em prever a viabilidade espermática de sêmen descongelado para uso em programas de inseminação artificial. Sendo assim, torna-se necessário uso de

testes complementares que possam elevar a acurácia em predizer a fertilidade do sêmen (CASTILHO, 2008). Tal observação é respaldada pelo presente experimento em que os valores médios obtidos no teste hiposmótico foram muito abaixo daqueles da motilidade espermática, indicando menor porcentagem de espermatozoides viáveis (Tabelas 3 e 5), dados esses que corroboram com Bittencourt et al. (2006), que observou 51% de motilidade e 16% de células integras no HOST, embora os autores utilizaram o glicerol como crioprotetor.

De forma geral, houve uma correlação média e positiva entre todos os tempos do TTR e o teste de INT: (0,40), (0,37), (0,45), (0,51), (0,47), (0,54) e (0,52).

O processo de criopreservação promove danos às membranas plasmáticas dos espermatozoides alterando seus domínios e funções de várias proteínas (proteínas transportadoras de íons, por exemplo) importantes no metabolismo espermático. As mudanças de temperatura, estresse osmótico e toxicidade devido ao uso dos crioprotetores (por exemplo, o glicerol), formação e dissolução dos cristais no ambiente extracelular, são as principais causas de injúrias subletais e letais aos espermatozoides (WATSON, 2000).

Foi observada correlação positiva alta entre motilidade e vigor espermáticos do sêmen descongelado em todos os tratamentos, em todos os tempos do TTR (todos acima de 0,55). Quanto ao INT e o vigor espermático houve correlação positiva e média somente nos tempos de 150 (0,53) e 180 min. (0,52) e baixa positiva nos tempos de 30 min. (0,33), 60 min. (0,29), 90 min. (0,48) e 120 min. (0,39) durante o TTR.

Provavelmente, a correlação positiva entre a motilidade do sêmen descongelado e vigor do mesmo pode explicar a diminuição de células funcionais em que um aumento da motilidade e do vigor, conseqüentemente aumentaria a produção de ROS (espécies reativas ao oxigênio), desencadeando assim um comprometimento da funcionalidade da membrana o que possivelmente pode ser explicado pelo aumento de células que apresentaram suas membranas lesionadas. Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), foi MacLeod (1943) o responsável pela primeira indicação de que o estresse oxidativo pode afetar a viabilidade e a função do espermatozoide, quando observou que o espermatozoide humano incubado na presença de elevadas concentrações de O₂ perdia rapidamente sua motilidade. Entretanto, pequenas quantidades de ROS desempenham um papel importante na função da célula espermática normal como a capacitação e a fusão espermatozoide-ovócito (TEMPLE, 2000), mas podem causar efeitos patológicos

com o estresse oxidativo quando a quantidade de ROS excede a quantidade de antioxidantes (SIKKA et al., 1995).

Não houve correlação ($P>0,05$) do vigor espermático com teste hiposmótico do sêmen descongelado em nenhum dos tempos do TTR, sendo que o mesmo ocorreu com o vigor espermático com análise morfológica.

Borges (2003) relata que muitos estudos não observaram diferenças significativas na morfologia espermática entre tratamentos no sêmen criopreservado.

Com o objetivo de compreender melhor a relação entre a motilidade espermática e o tempo de resfriamento, foi realizada uma análise de regressão. Para a motilidade progressiva, a função que melhor se ajustou ao modelo foi uma função quadrática. Como as variáveis de motilidade foram submetidas à transformação arco-seno, a equação teve de ser ajustada. A figura 5 mostra a curva com os valores de arco-seno da raiz quadrada da motilidade progressiva (em graus) de acordo com o tempo de resfriamento, deixando evidenciado o aspecto quadrático do modelo. Na figura 6 é apresentada a curva com os dados transformados de volta para as unidades originais.

$$\text{Arcsen } \sqrt{MOT} \times \frac{180}{\pi} = 4,45279 + 0,33003 \times RESF - 0,00062255 \times RESF^2$$

Ou

$$\left[\text{sen} \frac{(4,45279 + 0,33003 \times RESF - 0,00062255 \times RESF^2) \times \pi}{180} \right]^2$$

Onde:

MOT = Motilidade progressiva (em decimais)

RESF = Tempo de resfriamento em minutos

$R^2 = 0,3817$, ou seja, o modelo explica 38% da variação total

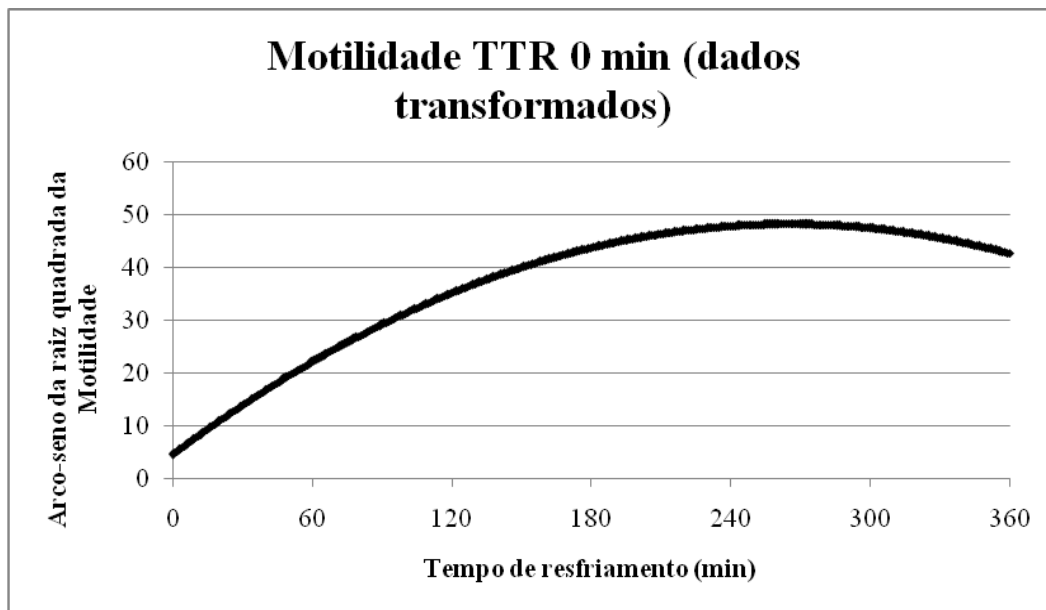


Figura 5. Valores de arco-seno da raiz quadrada da motilidade progressiva (em graus) de acordo com o tempo de resfriamento ($P < 0,05$). Ponto máximo da curva: 265 min, $\text{Arcsen}\sqrt{MOT} \times \frac{180}{\pi} = 48,2$.

Ainda segundo a Figura 6, o ponto máximo da curva seria aos 265 minutos (4 horas e 25 minutos), onde a motilidade atinge 55,6%. Contudo, deve-se ressaltar que o valor de R^2 foi de 0,38, ou seja, o modelo explica apenas 38% da variação total, sendo assim, o tempo de resfriamento não deve ser usado como único parâmetro para predição da motilidade espermática após o descongelamento.

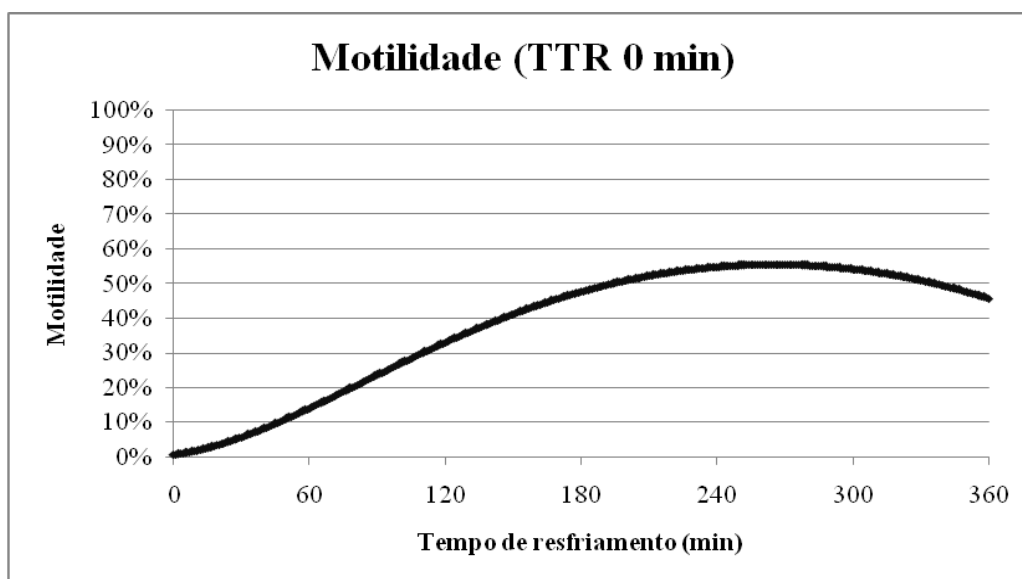


Figura 6. Motilidade progressiva do sêmen caprino pós-descongelamento em função do tempo de pré-congelamento. ($P < 0,05$).

5. CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que períodos mais longos de resfriamento durante o pré-congelamento diminuem as lesões causadas pelo processo de criopreservação no espermatozoide, sendo recomendado temporefriamento entre 4 e 6 h.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, J. R. Possible redox regulation of sperm motility activation. **Journal of Andrology**, v.21, p.491-496, 2000
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. **Equine Reproduction**, p.715-745, 1993.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-174, 1987.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2009.
- ARRUDA, R. P.; BARNABÉ, V. H.; ALENCAR, M. M. et al. Teste de termorresistência rápido: uma opção para avaliar a fertilidade do sêmen congelado bovino. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, **Anais...** Belo Horizonte, MG, p.178-179, 1997.
- AZEREDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evolution of plasma membrane integrity on frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257-263, 2001.
- BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISITIN, J. A. Estudo comparativo entre as provas rápidas e lenta de termorresistência para avaliação de sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.4, n.3-4, p.7-11, 1981.
- BEYGI, A; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertil females. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.77, p.117-121, 2007.
- BISPO, C. A. S. Avaliação “in vitro” do sêmen caprino resfriado a 5°C em função de curvas de resfriamento e diluidores. 2005. 79p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, 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, n.3, p.213-218, 2005.
- BITTENCOURT, R. F. 1; RIBEIRO FILHO, A. L.; ALVES, S. G. G.; BISCARDE, C. E.; VASCONCELOS, M. . F.; OBA, E. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.1, p. 27-37, 2006.
- BLOM, E. The ultra-structure of some characteristic sperm defects and proposal a new classification of the Bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 25, n.7, p. 383-391, 1973.
- BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. 2003. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), UFV, Viçosa, 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.
- BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, PANICH, S. P. L. KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.
- 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.
- CÂMARA, D. R.; SIMPLÍCIO, K. M. M. G.; PORTO, A. L. F.; PADILHA, R. T.; CAVALCANTI, M. T. H.; MOREIRA, K. A.; GUERRA, M. M. P. **Proteínas e colesterol do plasma seminal relacionados com diferentes graus de congelabilidade do sêmen em carneiros Santa Inês**. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.306, 2005. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista – UNESP – Jaboticabal, 2008.
- CARVALHO, G. R; FÜRST, M. C. O.; RUAS, J. R. M.; BORGES, A. M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v.57, n.5, p.599-607, 2005.
- CAVALCANTE, T. V. **Concentrações plasmáticas de testosterona e fertilidade de machos caprinos das raças Boer e alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva**. 2003. 77f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Veterinárias e Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

- CASTILHO, E. F. **Uso da propólis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino**. 2008, 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008.
- CASTILHO, E. F.; GUIMARÃES, J. D.; MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; BORELA, C. J. Uso de propólis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2335-2345, 2009.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ª Ed. Belo Horizonte. 15p., 1998.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- CELEGHINI, E. C. C., ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479-488, 2007.
- CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAO Animal Production and Health Paper, p.222. 1991.
- COOPER, T. G. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. Suppl. 53, p.119-136, 1998.
- CUASNICU, P. S., ELLERMAN, D. A., COHEN, D. J., BUSSO, D., MORGENFELD, M. M., AND DA ROS, V. G. (2001). Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. **Archives of Medical Research**, v.32, p.614-618, 2001.
- CUMMINS, J. Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. **Human Reproduction**, v.15, p.92-101, 2000.
- DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. A study on the characteristics of Beatal buck semen and its freez ability. **Journal of Veterinary Physiology and Allied Sciences**, v.12, n.2, p.6-16, 1993.
- DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. Acrosomal changes of buck spermatozoa at different periods of equilibration and after freezing with skimmed milk egg yolk glycerol extender. **Journal of the Assam Veterinary Council**, v.4, p.34-37, 1994.
- DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. Effects of equilibration periods on the motility of frozen buck semen in raffinose egg yolk glycerol extender. **Indian Journal of Animal Research**, v.29, n.2, p.141-144, 1995.

- DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. Acrosomal changes of buck spermatozoa after equilibration and freezing in egg yolk citrate glycerol extender. **Indian Veterinary Journal**, v.73, n.1, p.35-40, 1996.
- 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, n.2, p.231-238, 1986.
- DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Animal Medicin Veterinary**, v.4, p.215-224, 1967.
- DROBNIS, E. Z.; NELSON, E. A.; BURRIL, M. L. Effect of several processing variables on motility and glutamic oxalacetic transaminase levels for frozen goat semen. **Journal of animal Science**, v. 51, p. 439, 1980.
- 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 of Animal Health**, v.35, p.35-38, 1996.
- EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**. Cap. 2, p. 2977. New York: Raven Press. 1994.
- ENGLAND, G. C. W. Criopreservation of dog semen: 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**. Sydney: Butterworths, 194 p. 1987.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Semen y sus características. Inseminación artificial de ovejas y cabras. **Zaragoza: Editorial Acribia**, p.25. 1990.
- FLESCHE, F. M. e GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysics**, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- 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.
- GARDNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v.34; p.127-138; 1986.
- 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, 7. ed., 2004. 513p.

- HALLIWELL B, GUTTERIDGE J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, v. 4, p. 936, 1999.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343–352, 1990.
- HOLT, W. V. The sperm plasma membrane. In: International Symposium on Human Sperm Acrossome Reaction, Physiological and Pharmacological Induction and Transduction Pathways. **Proceedings**. France, 1995.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.
- JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinária**, v. 10, p. 180-190, 1994.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.
- KARATZAS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; BRIKAS, P. Fertility of freshand frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v.48, p.1049-1059, 1997.
- KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **Physiology of reproduction**. 3. Ed., Elsevier Academic Press USA, p.3062, 2006.
- KODAMA, H.; KURBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v.17, p. 151-157, 1996.
- KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of *in vitro* fertilizing capacity of spermatozoa. **Indian Veterinary Medical Journal**, v.24, p.1-6, 2000.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SAMAMOS, S. Production and storage of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.
- LEITE, T. G.; VALE FILHO, V. R.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; EMERICK, L. L.; ZAFFALONB, F. G.; MARTINS, J. A. M.; ANDRADE, V. J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.20, p.31-38, 2010.

- LENZI A, PICARDO M, GANDINI, L, DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, p.246-256, 1996.
- LIN, M.; MORSHEDI, M.; SRISOMBUT, C.; NASSAR A.; OEHNINGER. S. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of hypoosmotic swelling test, the water test, and cosin-Y staining. **Fertility and Sterility**, v.70, p.1148-1155, 1998.
- MACHADO, R.; SIMPLICIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19(1-2), p.61-72, 1995.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v.247, p.125-142, 1984.
- MAZUR, P.; RALL, W. F.; LEIBO, T. S. P. Kinetics of water loss and likelihood of intracellular freezing in mouse ova: influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability cell. **Biophysical Journal**, v.6, p.197-214, 1984.
- MEDEIROS, A. S. L.; GOMES, G. M.; CARMO, M.T.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.
- MEMON, M. A.; BRETZLAFF, K. N.; OTT, R. S. Comparison of semen collection techniques in goats. **Theriogenology**, v. 26, n.6, p. 823-827, 1986.
- MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, v.2, 1987, 701p.
- MOHANACHANDRAN NAIR, S. R.; KALATHARAN, J.; RAMAN, K. S. Evaluation of canine frozen semen by hypoosmotic swelling test. **Indian Journal of Animal Science**, v. 68, p.1179-1180, 1998.
- NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M. et al. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.
- NEILD, D. N.; GADELLA, B. M.; AGÜERO, A.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**. v.89, p.47-56, 2005.
- NUNES, J. F., CORTEEL, J. M., COMBARNOUS, Y., BARIL, G. Role du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozöids de bouc. **Reproduction Nutrition Développement**, v.22, p.611-620, 1982.
- NUNES, J. F. Inseminação Artificial em Caprinos. In: GONCALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p.111-125, 2002.

- OETTLÉ, E. E.; SOLEY, J. T. Ultrastructural changes in the acrosome of human sperm during freezing and thawed: a pilot trial. **Archives of Andrology**, v. 17, p. 145-150, 1986.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.
- PAULA, N. R. O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J. F. S.; SANTOS, D. O.; ELOY, A. M. X. **Reprodução no macho caprino: análise básica e aplicada**, 2008.
- PUGLIESI, G.; FÜRST, R.; CARVALHO, G. R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação de sêmen de garanhões. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.19, p.172-177, 2012.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of Cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Criobiology**, v.48, p.36-45, 2004.
- RAMOS, P. C. A. **Uso de antocianina na criopreservação de sêmen caprino. 2012.** 40f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- 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. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. **Australian Journal Biology Science**, v.36, p.49-59, 1983.
- RITAR, A. J.; BALL, P. D.; O'MAY, P. J. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.2, p.27-34, 1990.
- ROBERTS, S. J. Veterinary obstetrics and genital diseases **Theriogenology**, 3.ed. Michigan: Edwards Brothers, 981p., 1986.
- RODRIGUES-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 312-318, 2003.
- SALAMON, S.; RITAR, A. J. Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition, method and rate of dilution on survival of spermatozoa. **Australian Journal Biology Science**, v.35, p.295-303,1982.
- SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO, M.A.; MAGALHÃES, D. M.; CAVALCANTE, J. M. M; PALÁ-CIO, A. R. S. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, 2003.

- SANTOS, E. A.; TEIXEIRA, D. I. A.; LOPES JUNIOR, E. S.; CORDEIRO, M. F.; LIMA-VERDE, I. B.; PAULA, N. R. O.; PIMENTEL, N. C.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Características seminais, perímetro escrotal e comportamento sexual de bodes Saanen explorados em região litorânea do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.218-219, 2001.
- SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F.; BORGES, A. M.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; ROVAY, H. Parâmetros reprodutivos de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.1926-1933, 2006.
- 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**. 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.
- SINHA, S.; DEKA, B. C.; BORGOHAIN, B. N.; TAMULI, M. K. Study on freezing of goat semen in skim milk extender with different glycerol levels and equilibration periods. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.13, n.1, p.38-41, 1992.
- SIKKA, S. C., RAJASEKARAN, M., HELLSTROM, W. J. G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**. v.16, p.464-468, 1995
- SMITH, A.H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v.166, p.668-671, 1950.
- SÖDERQUIST, L., MADRID-BURY, N., RODRIGUESMARTINEZ, H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, v.48, p.1115-1125, 1997.
- SQUIRES, E. L.; KEITH, S. L.; GRAHAM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1056-1065, 2004.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, Bulletin. n.9. 1999. 80p.
- STROM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p.1199-1205, 1993.

- TEMPLE, N. J. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutrition Research**, v.20, p.449–459, 2000.
- VASQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; MARTINEZ, P. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to order for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p.913-922, 1997.
- VIDIGAL, K. F. **Integridade e funcionalidade da membrana plasmática, acrossoma e mitocôndrias espermáticas em caprinos segundo a conformação escrotal**. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.
- VOGLER, C. J.; SAACKE, R. G.; BAME, J. H. Effect of scrotal insulation on viability of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3827-3835, 1991.
- WATSON, P. F. The causes of fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.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.
- WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.62, p.483-492, 1981.
- WAY, A. L.; RENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Comparison of four staining methods for evaluating acrossome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.43, p.1301-1316, 1995.
- WESTHUYSEN, J. M. V. Observations on the deep-freezing of Angora goat semen. **South African Journal of Animal Science**, v.8, p.111-113, 1978.
- WITTE, T. S.; SCHÄFER-SOMI, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.181–193, 2007.
- WOLFE, C. A.; JAMES P. S.; MACKIE AR, LADHA S, JONES R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1506-1514, 1998.