

JÚLIO CÉSAR OLIVEIRA DIAS

**ADIÇÃO DE RINGER LACTATO, CITRATO DE SÓDIO 2,92 % E  
SOLUÇÃO TRIS EM SÊMEN CAPRINO DESCONGELADO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

JÚLIO CÉSAR OLIVEIRA DIAS

**ADIÇÃO DE RINGER LACTATO, CITRATO DE SÓDIO 2,92 % E  
SOLUÇÃO TRIS EM SÊMEN CAPRINO DESCONGELADO**

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

APROVADA: 16 de julho de 2010.

---

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres

---

Prof. Rogério de Paula Lana

---

Prof. Eduardo Paulino da Costa

---

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin

---

Prof. Antonio Bento Mancio  
(Orientador)

“Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.

Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta e interesseiro. Seja gentil assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros. Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.

Seja honesto assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra. Construa assim mesmo.

Se você tem paz, é feliz, as pessoas podem sentir inveja.

Seja feliz assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.

Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você, que no final das contas, é entre você e Deus.

Nunca foi entre você e as outras pessoas.”

Madre Tereza de Calcutá

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, apoio e por me darem tudo aquilo que muitas vezes lhes faltaram...

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, Tarquinio e Maria Serrat, e irmãos, Quiqui e Dé, pelas orações, incentivos e força, imprescindíveis, para realizar este trabalho e etapa.

Aos meus cunhados, Vitorino que sempre me incentivou nos estudos e tenho como um irmão, e Livia que sempre intercedeu por mim mesmo estando longe.

À minha princesa e sobrinha Maria Carolina, que é para o “Padrinho” um orgulho e exemplo de carinho.

A todos meus familiares, principalmente tia Graça, tio Mica e a vó Nicinha, pela torcida, incentivos e orações.

Ao professor orientador, Antonio Bento Mancio, pela amizade, confiança e, principalmente, pelos ensinamentos na área acadêmica.

Ao professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela atenção, orientação, amizade e confiança.

Ao professor Laércio dos Anjos Benjamim, pela amizade e confiança no meu trabalho antes mesmo de ingressar no Mestrado.

Ao professor Ciro Alexandre Alves Torres, pela atenção, convivência e disponibilidade.

Ao professor Eduardo Paulino da Costa, pela atenção e disponibilidade.

Ao professor José Domingos Guimarães, pelas dicas e orientações.

Ao professor Marcelo Teixeira Rodrigues, pela oportunidade que me foi concedida de realizar este experimento no setor de Caprinocultura.

Ao amigo e coorientador não oficial Charles, pela amizade e por ser tão disponível em ajudar.

À Celeste e Fernanda, secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia, pela paciência e dedicação.

À minha segunda família, a Família Santana. Aos meus “pais em Viçosa”, Vicente e Maria, ao Davi, Levi, seu Zé do Sítio e dona Conceição, pelo carinho, apoio, atenção, incentivo, força, amizade...

À Marina, pelo carinho e atenção; pela força e incentivo no início do Mestrado, e por confiar e acreditar em mim.

Aos amigos, companheiros e “olho junto” da Caprinocultura, Madriano, Jurandy (Jura), Giselle, Vivian e Flávia. A ajuda e dedicação de vocês foram fundamentais para que eu pudesse realizar este trabalho. Esse trabalho é de vocês também.

Aos outros amigos “olho junto” da Reprodução (Zootecnia/Veterinária), Camila, Priscila, Ludmila, Carlos, Damares, Fabiana, Flávia, Bruna, Bruno, Sanely, Leonardo, Rogério, Lincoln, Marcelo, João e Alberto, pela amizade, risos e trabalhos.

A todos outros amigos da Pós-Graduação, Raisa, Hanna, Renata (Candongueira), Ana Paula, Renan, Daniel, Pedro, Carol, Fabrício (ex-Bolão), Guilherme, Poliana Galvão, Silvia, Diogo, Lucas, Mococa, Mariana, Laila, Cibeli, Pablo e Juliana, pelo convívio e pela amizade.

Aos grandes amigos e irmãos de perto Diogo (Clóvis) e Nathália Thaís, e de longe Cida e Angélica, pelo companheirismo, carinho, risos (muitos) e atenção. Com vocês foi muito mais fácil passar pelos momentos difíceis e vivenciar os bons!!!

À Tamires, que mesmo lá em Petrópolis sempre torceu por mim e me deu muita força com incentivos e orações.

À Deborah, Carlota, Luciana, Thaisy e Amandinha, pela grandíssima amizade, força, risos e festas. Vocês são demais, sô! Companheiro é companheiro. Saudades!

Aos amigos da República ZenNoção, Rogério (Banana/Duley), Pedrão, Marcus, Tarcísio, André, Douglas e Martinha (nossa amiga e mãe da República), pela amizade, momentos de convívio e crescimento.

As minhas professoras e amigas, Alcione que esteve presente na minha alfabetização e Bia minha grande incentivadora a continuar na área acadêmica.

Aos amigos de Três Rios, Léo, Vânia, Tati e Bim, por me darem força, atenção e carinho mesmo de longe. Viva a internet!

Aos amigos da Capela Imaculado Coração de Maria da UFV, do Grupo de Oração Sagrado Coração de Jesus e Renovação Carismática Católica (RCC), por todos os momentos vividos, exercidos e experimentados juntamente com vocês no trabalho de evangelização em nossa universidade.

Aos amigos da Fraternidade Pequena Via, por todos os ensinamentos, orientações, orações e partilhas.

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

MUITO OBRIGADO!

## **BIOGRAFIA**

JÚLIO CÉSAR OLIVEIRA DIAS, filho de Tarquinio Lelis Dias e de Maria Serrat Oliveira Dias, nasceu em Três Rios, no estado do Rio de Janeiro, em 28 de janeiro de 1982.

Em março de 2003, iniciou o Curso de Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, graduando-se no dia 18 de janeiro de 2008.

Em agosto de 2008, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Fisiologia e Reprodução Animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se a defesa de dissertação em 16 de julho de 2010.

# CONTEÚDO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1. A inseminação artificial na caprinocultura .....	2
2.2. Diluentes do sêmen .....	4
2.2.1. Crioprotetores não-penetrantes .....	6
2.2.2. Crioprotetores penetrantes .....	7
2.2.3. Diluentes à base de TRIS .....	8
2.2.4. Diluentes à base de citrato de sódio e ringer com lactato .....	9
2.3. Resfriamento do sêmen .....	9
2.4. Congelamento do sêmen .....	11
2.5. Características físicas do sêmen .....	12
2.5.1. Volume .....	12
2.5.2. Coloração .....	13
2.5.3. Aspecto .....	13
2.5.4. Turbilhonamento .....	13
2.5.5. Motilidade .....	14
2.5.6. Vigor .....	14
2.5.7. Concentração .....	14
2.6. Características morfológicas do sêmen .....	15
2.7. Exames complementares do sêmen .....	16
2.7.1. Teste de termorresistência (TTR) .....	16
2.7.2. Coloração supravital (eosina/nigrosina) .....	16
2.7.3. Teste de ligação do espermatozóide à membrana da gema de ovo .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1. Localização .....	18
3.2. Animais e alimentação .....	19
3.3. Coletas de sêmen .....	19
3.4. Análises físicas do sêmen .....	20

3.5. Diluição do sêmen .....	22
3.6. Resfriamento do sêmen .....	22
3.7. Congelamento do sêmen .....	23
3.8. Delineamento experimental .....	23
3.9. Diluentes utilizados .....	23
3.10. Descongelamento e análises do sêmen .....	26
3.10.1. Coloração supravital .....	26
3.10.2. Teste de ligação do espermatozóide a gema membrana da gema do ovo .....	26
4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1. Sêmen fresco .....	28
5.2. Sêmen descongelado .....	31
6. CONCLUSÕES .....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 - Vagina artificial utilizada para coleta de sêmen nos bodes (modelo artesanal) .....	19
Figura 2 - Tubos de ensaio nas mamadeiras contendo as palhetas envasadas com o sêmen diluído .....	22

## LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 - Características físicas do sêmen descongelado para bodes doadores (palhetas de 0,25 mL) .....	15
Tabela 2 - Composição da solução 1 para produção do meio Glicose-EDTA gema de ovo (MARTIN <i>et al.</i> , 1979 modificado por BISPO, 2009) .....	23
Tabela 3 - Composição da solução 2 para produção do meio Glicose-EDTA gema de ovo (MARTIN <i>et al.</i> , 1979 modificado por BISPO, 2009) .....	24
Tabela 4 - Composição do meio diluente Ringer com Lactato (Equiplex®) .....	24
Tabela 5 - Composição do meio diluente Bull Media – TALP (B-TALP) .....	24
Tabela 6 - Composição do meio diluente citrato de sódio 2,92 % .....	25
Tabela 7 - Composição do meio diluente TRIS .....	25
Tabela 8 - Médias e desvios-padrão para volume, aspecto dos ejaculados, coloração, concentração e turbilhonamento do sêmen fresco .....	29
Tabela 9 - Médias e desvios-padrão para motilidade, vigor e morfologia do sêmen fresco .....	30
Tabela 10 - Médias e desvios- padrão para motilidade (MOT - %) e vigor (VIG - 0-5) no teste de termorresistência (37 °C) do sêmen descongelado nos tratamentos experimentais e em função do tempo (minutos) .....	31
Tabela 11 - Valores mínimos preconizados pelo CBRA para bodes doadores de sêmen (pós-descongelamento, palhetas de 0,25 mL) .....	31
Tabela 12 - Médias e desvios-padrão para motilidade (%) e vigor (0-5) no teste de termorresistência (TTR) do sêmen fresco em função do tempo .....	34
Tabela 13 - Médias e desvios-padrão para os testes de coloração supravital, de ligação e morfológico dos espermatozóides, entre tratamentos experimentais .....	35
Tabela 14 - Médias e desvios-padrão para motilidade (%), vigor (0-5) e teste supravital (% de células íntegras) do sêmen descongelado, entre os tratamentos .....	36

## RESUMO

DIAS, Júlio César Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2010. **Adição de ringer lactato, citrato de sódio 2,92% e solução TRIS em sêmen caprino descongelado.** Orientador: Antonio Bento Mancio. Coorientadores: Giovanni Ribeiro de Carvalho e Ciro Alexandre Alves Torres.

O experimento foi realizado no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa-MG. O objetivo foi adicionar, no descongelamento de sêmen caprino, as soluções de Ringer com lactato, citrato de sódio 2,92% e solução TRIS, para verificar a estabilidade e persistência da motilidade e vigor dos espermatozóides, assim como alterações da membrana plasmática. O sêmen foi coletado de machos caprinos adultos, sadios, com histórico de fertilidade normal, durante a estação de monta natural (março a abril de 2010). Foram avaliadas as características físicas do sêmen no momento da coleta e no descongelamento das palhetas, as quais passaram por um processo de resfriamento médio. Ainda após o descongelamento, foram realizados três testes complementares: teste de termorresistência (TTR), supravital e de ligação do espermatozóide na gema de ovo. Todos os valores médios obtidos para o sêmen fresco quanto a volume (mL), motilidade (%), vigor (0-5), concentração espermática ( $\times 10^9$  totais), e morfologia (% normais) foram condizentes ao preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), sendo de  $1,0 \pm 0,04$ ;  $83,1 \pm 0,54$ ;  $3,9 \pm 0,08$ ;  $3,3 \pm 0,2$  e  $90,8 \pm 0,85$ , respectivamente. Os parâmetros motilidade ( $33,1 \pm 1,8\%$ ) e vigor ( $3,0 \pm 0,1$ ) do sêmen analisado no pós-descongelamento (5 minutos) também atenderam o que é estabelecido pelo CBRA no início do TTR; porém, o período de sobrevivência do sêmen não ultrapassou os 90 minutos após o descongelamento, diminuindo bruscamente com o passar do tempo. O tratamento controle foi o que obteve maior motilidade no descongelamento ( $42,2 \pm 2,0$ ) e o tratamento que recebeu a solução TRIS apresentou maior persistência (90 minutos) e diminuição menos abrupta dos parâmetros motilidade e vigor, em relação aos outros tratamentos. Em todos os tratamentos, após 30 minutos de TTR, os parâmetros estavam aquém do preconizado pelo CBRA. Uma possível explicação para a solução TRIS ter permitido persistência e diminuição menos abrupta dos parâmetros motilidade e vigor pode ser devido o aumento de volume e diluição dos elementos que poderiam estar sendo tóxicos aos espermatozóides

(radicais livres) e, também, a adição de frutose (substrato energético), TRIS e ácido cítrico (agentes tamponantes). Os testes complementares (teste de ligação do espermatozóide na gema de ovo e teste supravital) realizados neste trabalho não apresentaram diferença entre tratamentos ( $P>0,05$ ). Foi encontrada correlação positiva entre a motilidade e o exame supravital, podendo o teste ser considerado uma ratificação dos valores de motilidade aferidos subjetivamente pelo pesquisador. Não foi encontrada diferença significativa entre as alterações morfológicas observadas após a criopreservação em relação ao sêmen fresco. Concluiu-se, assim, que a adição das soluções Ringer lactato, citrato de sódio 2,92% e solução TRIS não permitiu maior persistência da motilidade e vigor após o descongelamento. Sugere-se a realização de testes *in vivo* a fim de verificar se o tempo de sobrevivência apresentado após adição dos diluentes é suficiente para se realizar a fertilização, uma vez que se pode contar com o auxílio de fatores inerentes a fêmea (nutrição e auxílio na movimentação do espermatozóide). Recomenda-se ainda, o uso de sondas fluorescentes na avaliação espermática para se verificar melhor a integridade da membrana dos espermatozóides, pois os espermatozóides neste trabalho possuíam motilidade após o descongelamento, mas as suas membranas poderiam estar alteradas a ponto de não suportarem o desafio da temperatura (37 °C) por longo período.

## ABSTRACT

DIAS, Júlio César Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Addition of Ringer lactate, sodium citrate and 2,92% in TRIS solution thawed goat semen.** Adviser: Antonio Bento Mancio. Co-advisers: Giovanni Ribeiro de Carvalho e Ciro Alexandre Alves Torres.

The experiment was performed at the Caprinocultura Department of Animal Science, Federal University of Viçosa, in Viçosa-MG. The goal was to add in the thawing of goat semen, solutions of Ringer's lactate, sodium citrate and 2.92% and TRIS solution to verify the stability and persistence of sperm motility and strength as well as changes in the plasma membrane. Semen was collected from adult male goats were healthy with history of normal fertility, during the natural breeding season (March-April 2010). We evaluated the physical characteristics of semen at collection and the thawing of straws, which have undergone a process of cooling medium. Even after thawing were performed three additional tests: test of heat resistance (TTR), supravital and bonding sperm in egg yolk. All average values for fresh semen as the volume (mL), motility (%), strength (0-5), sperm concentration ( $\times 10^9$  total) and morphology (% normal) were consistent with that recommended by the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA), being  $1.0 \pm 0.04$ ,  $83.1 \pm 0.54$ ,  $3.9 \pm 0.08$ ,  $3.3 \pm 0.2$  and  $90.8 \pm 0.85$ , respectively. The parameters motility ( $33.1 \pm 1.8\%$ ) and strength ( $3.0 \pm 0.1$ ) semen analysis in the post-thawing (5 minutes) also attended what is established by CBRA the beginning of the TTR, but the period of survival of semen did not exceed 90 minutes after thawing, decreasing sharply over time. The treatment control was the with highest motility after thawing ( $42.2 \pm 2.0$ ) and the treatment received the TRIS solution showed greater persistence (90 minutes) and less abrupt decline in motility parameters and force in relation to other treatments. In all treatments, after 30 minutes of TTR, the parameters were lower than those recommended by the CBRA. One possible explanation for the TRIS solution have allowed persistence and less abrupt decline in motility and strength parameters may be due to the increase in volume and dilution of the elements that could be being toxic to sperm (free radicals) and also the addition of fructose ( substrato energy), TRIS and citric acid (buffering agent). Additional tests (test of binding of sperm in egg yolk and supravital test) performed in this study showed no difference between treatments ( $P > 0.05$ ). A positive

correlation between motility and supravital test, the test can be considered a ratification of motility assessed subjectively by the researcher. No significant difference was found between the morphologic alterations observed after cryopreservation compared to fresh semen. It was concluded therefore that the addition of Ringer lactate, sodium citrate 2.92% and TRIS solution did not allow greater persistence of motility and vigor after thawing. We suggest the *in vivo* tests to verify whether the survival time after addition of diluents presented is sufficient to achieve fertilization, since it can count on the assistance of the female external factors (nutrition and aid in movement of sperm). It is further recommended the use of fluorescent probes to assess sperm to better verify the membrane integrity of sperm, since sperm motility in this study had motility after thawing, but their membranes could be altered to the point of not supporting the challenge of temperature (37 °C) for long periods.

## 1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura e a ovinocultura são as atividades mais comuns no setor pecuário da região nordeste do Brasil. Essa predominância acontece não só por uma questão histórica, mas também por adaptações destas espécies às adversidades climáticas e limitações do solo e vegetação que restringem a exploração de outras espécies animais. Nos últimos 15 anos vem ocorrendo grande expansão destas atividades para outras regiões do país; porém, a maior parte do rebanho nacional ainda se concentra na região nordeste, com 91,4% do efetivo nacional (ANUALPEC, 2009).

A caprinocultura enfrenta alguns desafios para expandir a produção e atender o mercado consumidor. Apesar da demanda por produtos lácteos e cárneos ter crescido o rótulo de 'atividade de subsistência' ainda é presente em algumas regiões do Brasil. O padrão extensivo de produção e os baixos níveis de tecnologias se somam à falta de organização e integração da cadeia produtiva e, assim, diminuem a produção e expressão da caprinocultura no mercado (XIMENES *et al.*, 2009).

Segundo XIMENES *et al.* (2009), as técnicas de manejo reprodutivo (MR), quando devidamente implementadas, são fortes aliadas e respondem por significativas melhoras na organização da unidade produtiva, no desempenho reprodutivo e desfrute dos rebanhos, com conseqüente retorno econômico ao produtor.

A inseminação artificial (IA) é técnica importante no manejo reprodutivo do rebanho, além de ser utilizada como ferramenta para várias outras biotecnologias ligadas à reprodução animal. Com a utilização da IA, pode-se realizar o melhoramento genético do rebanho com maior rapidez e eficiência, introduzindo genes no rebanho que elevarão a qualidade ou produtividade. Também é utilizada para preservar a genética de raças sob o risco de extinção, e de animais que já tenham morrido ou não se encontram mais na propriedade (MACHADO e SIMPLICIO, 1995).

Em algumas regiões do Brasil, a espécie caprina sofre influência do fotoperíodo e, assim, devido a estacionalidade reprodutiva, geralmente não é possível obter bons resultados na distribuição de partições ao longo do ano quando se utiliza o estro natural. Mediante nutrição adequada das fêmeas, uma

alternativa é a sincronização artificial do estro em qualquer época do ano e a utilização de IA nas cabras. Dessa forma, o produtor poderá ofertar os produtos caprinos ao mercado consumidor durante todo o ano (MACHADO e SIMPLICIO, 1995; GONÇALVES *et al.*, 2001).

A técnica de IA consiste em depositar no trato reprodutivo da cabra o sêmen anteriormente coletado e acrescido de diluente, na forma resfriada ou descongelada. Todos os procedimentos realizados com o sêmen visam não só aumentar o número de doses inseminantes com um único ejaculado, mas também proteger e preservar os espermatozóides, para que possam encontrar o oócito ovulado e fecundá-lo eficientemente.

Os diluentes utilizados como extensores do sêmen são variados em eficiência e em quantidade e qualidade de seus componentes. Entretanto, todos têm como principal objetivo e fundamental importância a preservação dos espermatozóides através da nutrição, proteção de suas membranas plasmáticas e equilíbrio osmótico do meio.

Os valores de motilidade e vigor dos espermatozóides em relação ao tempo são alguns dos parâmetros que podem demonstrar a eficiência dos diluidores. Desconsiderando as vias inerentes às fêmeas, pode-se esperar que as células com pouca movimentação e, ou, pouca velocidade e com alteração na membrana plasmática possuam baixa capacidade de encontrar e fecundar um oócito *in vivo*.

Desta forma, objetivou-se com este trabalho verificar a estabilidade e persistência da motilidade e vigor dos espermatozóides, assim como alterações da membrana plasmática, após adição de Ringer com lactato, citrato de sódio 2,92% e solução TRIS, no sêmen caprino descongelado.

Após o descongelamento, a adição destas soluções no sêmen caprino manteria o vigor e motilidade dos espermatozóides mais estáveis e persistentes por um maior período de tempo, com pouca alteração na membrana espermática.

Se alcançado este objetivo, no momento da criopreservação das palhetas, além do sêmen caprino diluído com o diluente de escolha, poderiam ser acrescidas estas soluções, separadas do sêmen por uma coluna de ar. Assim, no descongelamento, as soluções se misturariam ao sêmen melhorando ou preservando a sua qualidade.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A inseminação artificial na caprinocultura

A inseminação artificial (IA) representa uma biotecnologia de reprodução assistida que possibilita a utilização de indivíduos geneticamente superiores, sem a necessidade dos mesmos estarem presentes nas propriedades. Com isso, se elimina a necessidade de transporte dos animais, diminuindo-se custos com alimentação e inconvenientes da manutenção de grande número de machos na propriedade.

Ainda pode-se considerar a IA como uma ferramenta de manejo zootécnico, que permite registros precisos sobre a reprodução do rebanho e possibilita a realização de programas de acasalamento e controle de determinadas enfermidades. No melhoramento genético do rebanho, ela é instrumento que permite o uso e multiplicação de sêmen de bodes qualificados como superiores em testes de performance ou progênie (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1995; SIQUEIRA, 2006).

Acredita-se que as primeiras inseminações realizadas no país com sêmen caprino congelado foram, provavelmente, descritas por França em 1981 (XIMENEZ, 2009); porém, a utilização da IA na espécie caprina, no Brasil e no mundo, ainda não acontece no mesmo nível que os bovinos.

MACHADO *et al.* (1997) mostraram que a IA em caprinos é viável economicamente; porém, a ausência de informações técnicas aos criadores e de organização da cadeia produtiva da caprinocultura, dificultaram a divulgação e expansão da técnica nos rebanhos. Alguns aspectos relativos a anatomia da cabra e à ausência de uma técnica de inseminação de simples execução, eficaz e de baixo custo complementaram o problema (BISPO, 2009; XIMENES *et al.*, 2009).

Podem também, serem considerados como entraves na utilização da técnica em caprinos, o custo inicial de implantação, a baixa disponibilidade de sêmen e de reprodutores submetidos aos testes de progênie e, principalmente, as dificuldades no processo de preservação do sêmen sob a forma congelada, com resultados insatisfatórios nos índices de concepção (RITAR e SALAMON, 1983; KARATZAS *et al.*, 1997).

A inexistência de técnicas rápidas, eficazes e seguras para se avaliar a capacidade fecundante da célula espermática caprina, antes e após o processo de congelamento, ainda representa desafios a serem solucionados. LUZ *et al.* (2000) concluíram que por meio de avaliação conjunta do percentual de células espermáticas íntegras, da motilidade progressiva individual após a descongelação e do teste de termorresistência, é possível estimar-se a capacidade fecundante do sêmen ovino congelado.

## **2.2. Diluentes do sêmen**

A maioria dos diluidores ou extensores seminais é baseado em leite ou gema de ovo. Um grande problema destes extensores contendo leite ou gema de ovo é o fato de serem substâncias biológicas e terem seus elementos constituintes em concentrações diferentes entre os lotes/partidas utilizados.

Além da diluição do plasma seminal, os diluidores possuem componentes que mantêm a osmolaridade adequada e o equilíbrio eletrolítico do meio, controlam o crescimento bacteriano, proporcionam o tamponamento de pH e fornecem nutrientes como fonte de energia aos espermatozóides. Os extensores seminais também possibilitam aumento do volume do ejaculado, protegem os espermatozóides (membranas plasmáticas) dos efeitos danosos das mudanças térmicas (choque térmico) e facilitam a visualização da motilidade espermática (AISEN, 2008).

Portanto, pode-se observar que a principal função do diluente é proteger os espermatozóides de danos irreversíveis e aumentar a sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea. Entretanto, os crioprotetores não garantem a sobrevivência de 100% das células espermáticas por também possuírem efeitos tóxicos sobre elas, dependendo da concentração utilizada no meio diluidor (FAHY, 1986).

Sabe-se que o sêmen caprino apresenta particularidades que diferenciam de outras espécies, sendo a mais importante a síntese e secreção no plasma seminal de enzimas com atividade fosfolipase pelas glândulas bulbo-uretrais (SIMPLÍCIO e MACHADO, 1989; LEBBOEUF, 2000).

Segundo Iritani e Nishikawa (1964), essas enzimas catalisam a hidrólise de lecitinas presentes na gema de ovo em lisolecitinas, que têm ação

detergente sobre lipídios de membrana, e em ácidos graxos altamente tóxicos para os espermatozóides (PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997). Sendo a lecitina também presente nas membranas plasmáticas dos espermatozóides, a composição enzimática do sêmen do bode e dos diluidores assume grande importância no processo de conservação do sêmen congelado (SIMPLÍCIO E MACHADO, 1989).

Os elementos que compõem o diluidor são chamados de crioprotetores, podendo ser classificados, de acordo com sua permeabilidade nas membranas celulares, em não-penetrantes (macromoléculas) e penetrantes (micromoléculas), os quais atravessam a membrana do espermatozóide e atuam nos meios intra e extracelular.

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

Os diluidores ainda contêm crioprotetores que agem como tampão (Tris, EDTA, ácido cítrico), um ou mais carboidratos (glicose, frutose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), sais (citrato de sódio, ácido cítrico) e antibióticos (penicilina e estreptomicina, ou gentamicina) (EVANS e MAXWELL, 1987; BISPO, 2009).

Quanto as suas funções alguns crioprotetores podem interagir com a membrana celular, e proporcionar sua estabilização, evitando assim sua lesão (MASSIP *et al.*, 1986). Outras substâncias podem atuar na diminuição da produção de “cristais de gelo intracelular” que são formados ao congelamento da água livre intracelular.

Ainda existem aqueles que têm a função de diminuir o “efeito solução” que ocorre com a exposição das células espermáticas não congeladas às altas concentrações de solutos durante a criopreservação. Deste modo, por osmose, os espermatozóides perdem água para o meio, reduzem o volume celular e correm o risco de romper as membranas plasmáticas (GRAHAM, 1996; AISEN, 2008).

O metabolismo espermático resulta em grande quantidade de metabólitos tóxicos, acarretando aumento da concentração de íon hidrogênio e ácido láctico no meio extracelular. Este acúmulo pode causar a morte das

células espermáticas devido a drástica diminuição do pH no meio (FARSTAD, 1996; HOLT, 2000). Diante disso, também podemos considerar o diluente como um meio neutralizador dessas substâncias tóxicas ao sêmen.

### **2.2.1. Crioprotetores não-penetrantes**

Sem penetrar na célula, algumas substâncias como lipídeos, proteínas e outras macromoléculas são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelamento: gema de ovo, leite, carboidratos (glicose, frutose, lactose, sacarose, manose, rafinose, trealose), polímeros sintéticos (polivinilpirrolidona e metilcelulose) e albumina sérica bovina (HOLT, 2000; LEBOUF *et al.*, 2000; HAFEZ, 2004).

Os crioprotetores não-penetrantes, quando presentes nos diluidores seminais, tornam o ambiente hipertônico, o que possibilita a desidratação celular e redução de cristais de gelo intracelulares. Desta forma, eles auxiliam os crioprotetores penetrantes ao reduzir a quantidade destes agentes no diluente, minimizando os seus efeitos tóxicos.

Paralelamente, ou como uma segunda função, os carboidratos presentes no meio diluente atuam diretamente nas células espermáticas evitando danos causados pela desidratação. Eles estabilizam a bicamada lipídica promovendo alterações na permeabilidade e na separação lateral dos componentes da membrana plasmática (ALBERTI, 2004).

A frutose e glicose são os carboidratos utilizados como fonte energética pelos espermatozoides. Talvez como uma de diferenciar e não competir com outras células do organismo, as células espermáticas utilizam a frutose como primeira opção na síntese de energia (GONZALES *et al.*, 1984). Convém lembrar que o ácido cítrico também é uma importante fonte de energia para os espermatozoides e, semelhante à frutose, possui função tamponante no meio, sendo ambos encontrados em níveis elevados no plasma seminal (MANN, 1974).

A gema do ovo, em associação com outros componentes, pode aumentar a resistência dos espermatozoides ao choque térmico. Este efeito pode ser atribuído, principalmente, às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) contidas na gema (BERGERON e MANJUNATH, 2006).

Acredita-se que o LDL adere à membrana plasmática durante o processo de criopreservação (MOUSSA *et al.*, 2002), restaurando a perda de fosfolipídios, com conseqüente prevenção da ruptura da membrana (FARSTARD, 1996). A importância dessa proteção ao espermatozóide se dá principalmente durante o processo de resfriamento a 5°C (fase de equilíbrio).

Segundo GONZALEZ (2004), a gema do ovo auxilia no tamponamento osmótico, permitindo o sêmen suportar qualquer meio hiper ou hiposmótico, e também permite redução da concentração de glicerol (crioprotetor penetrante).

Os diluidores a base de gema de ovo mais utilizados no resfriamento do sêmen caprino são Glicose-EDTA (Martin *et al.*, 1979) e TRIS-Gema (Salamon e Ritar, 1982; Evans e Maxwell, 1990).

O ácido cítrico e o Tris (hidroximetil)-aminometano são utilizados como base ou principal componente de vários diluentes, e ambos têm função de tamponar o meio (SALVIANO *et al.*, 2008) com papel importante na manutenção do equilíbrio osmótico.

### **2.2.2. Crioprotetores penetrantes**

Os crioprotetores penetrantes são substâncias que têm capacidade de proteção intracelular das células espermáticas; porém, também atuam no meio extracelular, diminuindo as lesões de origem química ou mecânica que o congelamento causa na célula.

O glicerol foi o primeiro crioprotetor penetrante utilizado no congelamento de sêmen, e até hoje é o mais utilizado no congelamento de sêmen caprino (BARBOSA, 1999; LEBOEUF *et al.*, 2000). No entanto, o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido (DMSO) e as amidas também são comumente utilizados (HOLT, 2000).

A forma de proteção do glicerol às células espermáticas se dá pela redução da concentração do soluto nos meios intra e extracelulares, diminuindo a formação e tamanho de cristais de gelo (DALIMATA e GRAHAM, 1997) por meio de ligações de hidrogênio entre moléculas de água e seus três grupos funcionais de hidroxilas.

Além dessas ações que reduzem de forma indireta os danos à membrana plasmática dos espermatozoides, Kundu *et al.* (2000) sugeriram que

moléculas de glicerol têm capacidade de ligar seus átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila aos átomos de oxigênio dos grupos fosfato dos fosfolipídios da membrana do espermatozóide, promovendo assim a estabilização da membrana durante o processo de criopreservação (proteção direta).

Essas propriedades são favorecidas por sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa. No entanto, apesar de seus efeitos positivos no processo de criopreservação celular, o glicerol pode também produzir alterações nos espermatozoides, por apresentar graus de toxicidade dependendo da concentração utilizada (acima de 7%).

Esses efeitos tóxicos podem ser mudanças nas estruturas citoplasmáticas, alteração da polimerização da tubulina e alteração direta nas proteínas da membrana plasmática (HAMMERSTEDT e GRANHAM, 1992; PARKS e GRAHAM, 1992). O glicerol pode, ainda, induzir a reação acrossomal em espermatozoides de carneiros, e isto pode estar relacionado com baixas taxas de prenhez (SLAVIK, 1987).

### **2.2.3. Diluentes à base de TRIS**

O TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano- $H_2NC(CH_2OH)_3$ ) é o principal componente básico dos diluentes de sêmen caprino utilizados rotineiramente (DORADO *et al.*, 2007). Tem maior poder tampão que o fosfato e o citrato, além de poder ultrapassar a membrana plasmática e minimizar as variações intracelulares de pH (SALAMON e MAXWELL, 2000; SALVIANO *et al.*, 2008).

Alguns pesquisadores utilizam o tampão TRIS-frutose original (EVANS e MAXWELL, 1990), enquanto outros preferem adaptar este tampão substituindo a frutose pela glicose ou pelos dissacarídeos não penetrantes, sacarose e lactose, que podem ainda agir como crioprotetores extracelulares.

Na composição do diluidor TRIS-gema, além do TRIS – hidroximetil aminometano (3,63 g) e gema de ovo (2,5 mL), existem também frutose (0,5 g), ácido cítrico-monohidratado (1,99 g) e água destilada (q.s.p 100 mL) (EVANS e MAXWELL, 1990).

#### **2.2.4. Diluentes à base de citrato de sódio e Ringer com lactato**

O citrato, designação genérica dos sais do ácido cítrico, é o principal nutriente produzido pela próstata como alimento para os espermatozóides. O citrato de sódio (citrato trissódico -  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) é o sal de sódio do ácido cítrico, um agente tamponante que resiste a mudanças no pH do meio (WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre, 2009).

Por outro lado, Machado e Simplício (1995) afirmaram que, energeticamente, o citrato é pouco importante para o metabolismo intermediário do espermatozóide, mas favorece a entrada mais lenta do crioprotetor glicerol no interior da célula espermática, auxiliando na regulação do equilíbrio osmótico durante o processo de congelamento.

O diluente citrato-gema consiste em uma solução de citrato de sódio (2,37 g), gema de ovo (2,5 mL) e água destilada (q.s.p. 100 mL) podendo ser acrescentado glicose (0,80 g) que servirá como fonte de energia (EVANS e MAXWELL, 1990). Neste diluente, o citrato funciona também como um diluidor da gema de ovo no meio líquido, favorecendo a sua ação sobre os espermatozóides. Segundo Holt (2000), o citrato pode atuar como quelante de cálcio, diminuindo a quantidade que atravessa a membrana espermática.

Assim como o citrato de sódio 2,92%, a solução fisiológica Ringer lactato é isoosmótica (AISEN, 2008) e pode ser utilizada como extensor ou expansor do sêmen. Geralmente, essas soluções são utilizadas para uma pré-diluição do ejaculado e avaliação da motilidade e vigor, ou ainda, como tampão de lavagem do sêmen a ser centrifugado (MIES FILHO, 1987; MACHADO e SIMPLICIO, 1995; DELL'AQUA JUNIOR e PAPA, 2001).

#### **2.3. Resfriamento do sêmen**

De acordo com Fürst (2006), os principais danos sofridos pela célula no processo de criopreservação ocorrem durante os processos de resfriamento e descongelamento. Portanto, uma taxa de resfriamento e aquecimento adequada, e a adição de crioprotetores nos diluentes se fazem necessários para prevenir danos causados à membrana plasmática pelo choque térmico.

Segundo Mies Filho (1987), o choque pelo frio pode levar ao dobramento/enrolamento da cauda dos espermatozóides, fazendo com que tenham movimentos anormais ou perda de motilidade. Também, pode ocasionar danos ao acrossomo e instabilidade da membrana plasmática por alterar sua composição, organização e permeabilidade. Conseqüentemente, pode ocorrer rompimento e evasão de conteúdo intracelular para o meio externo (GRAHAM, 1996). Esses danos sofridos pelas células espermáticas podem ser considerados como irreversíveis, e caso elas sejam utilizadas na inseminação artificial, a capacidade fecundante e a taxa de fertilidade do rebanho serão reduzidas.

A curva de resfriamento é considerada um dos pontos críticos ao processo de criopreservação do sêmen (WATSON, 1981). Durante o resfriamento, a taxa de queda de temperatura entre 19 e 8°C é um importante fator na ocorrência de alterações morfológicas e funcionais do espermatozóide (GRAHAM, 1996). Segundo Evans e Maxwell (1990), a faixa na qual os espermatozóides são mais sensíveis ao choque térmico fica entre 15 e 0°C.

A curva de resfriamento pode ser rápida (queda maior que 1°C/min.), média (queda entre 1–0,3°C/min.) e lenta (queda menor que 0,3°C/min.) (JASKO *et al.*, 1991). Segundo MACHADO e SIMPLÍCIO (1995), após a diluição, o sêmen caprino deve sofrer uma queda gradual da temperatura a velocidade de 0,25 a 0,35°C/min. até que alcance a temperatura de 5°C.

O tempo que o sêmen permanecerá na temperatura de 5°C, após ser atingido no resfriamento, é chamado de período de equilíbrio. 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 espermatozóides (EVANS e MAXWELL, 1990). Durante o período de equilíbrio, ocorre o equilíbrio osmótico entre os meios extra e intracelulares, e interação das células espermáticas com os constituintes do diluente, adquirindo resistência aos possíveis danos causados pela criopreservação (BOUCHARD *et al.*, 1990; ENGLAND, 1993).

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. Enquanto Das e Rajknovar (1995) e Dutta *et al.* (1996) concordam que o

período de equilíbrio ideal para o congelamento de sêmen caprino deveria ser uma a quatro horas, Ritar *et al.* (1990) disseram que se o tempo utilizado de resfriamento for de 1-1,5 hora (30°C a 4–5°C) não é necessário a realização do tempo de equilíbrio.

#### **2.4. Congelamento do sêmen**

Com a descoberta do glicerol como crioprotetor há aproximadamente 50 anos, iniciou o processo de congelação de sêmen, o que permite armazenar ejaculados por tempo indeterminado e utilizá-los a qualquer momento na IA ou em outras biotecnologias da reprodução (HOLT, 2000). Entretanto, a viabilidade do sêmen congelado/descongelado é menor do que quando se utiliza o sêmen fresco diluído ou resfriado, devido as alterações causadas no processo de criopreservação e ao efeito tóxico de algumas substâncias usadas como crioprotetores (WATSON, 2000).

A criopreservação de sêmen bovino é uma metodologia amplamente estudada e utilizada e, atualmente, poucas inovações vêm sendo atribuídas na técnica de congelamento do sêmen desta espécie. Já na espécie caprina, muitas investigações têm sido conduzidas sobre a criopreservação do sêmen e todas as etapas envolvidas no processo (LEBOEUF *et al.*, 2000; ROVAY, 2006; BISPO, 2009).

No processo de criopreservação do sêmen, as células espermáticas passam primeiro pelos processos de resfriamento, e de desidratação, que é promovida pelo meio diluente hiperosmótico. Com as membranas plasmáticas protegidas, pouca água livre intracelular e o ambiente controlado osmoticamente, os espermatozóides são congelados em nitrogênio líquido e mantidos em baixas temperaturas (-196°C) até serem descongelados para utilização (MEDEIROS *et al.*, 2002).

A curva de congelamento quando é adequada promove desidratação progressiva das células espermáticas e as mesmas são funcionais no descongelamento. De forma contrária, o processo de desidratação excessivo aumenta as concentrações de solutos intracelulares alterando o pH e osmolaridade do meio (WATSON, 1995).

O congelamento lento pode causar danos aos espermatozóides devido à formação de cristais de gelo extracelular, com posterior troca de água entre o meio extra e intracelular, a fim de manter o equilíbrio osmótico. Nesse caso, as concentrações de soluto dentro da célula aumentam. Por outro lado, o resfriamento rápido pode provocar o fenômeno da cristalização dentro das células espermáticas, com formação de grandes cristais de gelo, o que pode causar danos físicos à célula (GRAHAM, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2002).

## **2.5. Características físicas do sêmen**

A avaliação física e bioquímica do sêmen é baseada em diversos parâmetros, os quais são essenciais para determinar a qualidade do sêmen e a possibilidade de sua criopreservação. Dentre as análises físicas, pode-se destacar a avaliação do volume, da coloração, do aspecto, do turbilhonamento, da motilidade, do vigor, da concentração e da morfologia dos espermatozóides.

### **2.5.1. Volume**

O volume do ejaculado de caprinos varia de 0,5 a 2 mL (MIES FILHO, 1987; HAFEZ, 2004), sofrendo influência do método de coleta de sêmen, da raça, do fotoperíodo, do número de coletas e do tempo de excitação do macho (PAULA *et al.*, 2008).

A coleta realizada com eletroejaculador induz maior secreção pelas glândulas anexas e, assim, há um aumento do volume coletado devido a maior presença de plasma seminal. O método da vagina artificial permite que seja liberado volume seminal mais próximo daquele observado fisiologicamente (CBRA, 1998), e assim, a diluição do sêmen não será aumentada. Convém ressaltar, que a diminuição da liberação do plasma seminal também pode influenciar na menor concentração de fosfolipases no sêmen.

A produção de sêmen no bode é constante; porém, os caprinos sofrem influência do fotoperíodo, e na época da estação sexual, por estímulos endócrinos, as células de Leydig produzem maior quantidade de testosterona. Esse hormônio masculino leva ao maior desenvolvimento das glândulas

sexuais acessórias e, conseqüentemente, aumento da produção do plasma seminal e do volume do ejaculado (COELHO *et al.*, 2006).

No momento da coleta do sêmen, a presença da fêmea em estro diante do macho por períodos prolongados, pode levar a maior quantidade de plasma no ejaculado devido a uma grande estimulação das glândulas sexuais.

### **2.5.2. Coloração**

A coloração do sêmen caprino varia de acordo com a concentração espermática e a presença de plasma, mas geralmente tende a ser amarelada. 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 citrina, que é característico da presença de urina no sêmen (presença de odor de urina) (MIES FILHO, 1987; HAFEZ, 2004).

### **2.5.3. 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 e aquoso, sendo que o primeiro se deve à maior concentração de células espermáticas (MIES FILHO, 1987).

### **2.5.4. Turbilhonamento**

O turbilhonamento ou movimento de massa é o movimento em forma de ondas observado em uma gota de sêmen sem diluente no microscópio de luz. A interpretação é subjetiva e expressada em uma escala de 0 a 5, onde zero é a ausência de turbilhão, não implicando em ausência de motilidade, e cinco o valor máximo dado a um acentuado movimento de massa. A intensidade do

movimento é resultante da motilidade, do vigor e da concentração espermática (CBRA, 1998).

O turbilhonamento é observado particularmente em ruminantes e sofre influência de fatores extrínsecos, como método de coleta, condições de preservação e temperatura da amostra (CBRA, 1998).

#### **2.5.5. Motilidade**

A motilidade espermática expressa a percentagem (0-100%) de espermatozóides móveis e, da mesma forma que no turbilhonamento, é uma avaliação subjetiva (CBRA, 1998). Para uma correta avaliação, 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).

Outros métodos de avaliação menos subjetivos são a fotomicrografia ou avaliação computadorizada (CBRA, 1998).

#### **2.5.6. Vigor**

O vigor representa a força ou velocidade com que os espermatozóides se movimentam (CBRA, 1998). Este parâmetro é classificado de 0 (sem movimento progressivo) a 5 (movimento rápido e progressivo, como flechas).

#### **2.5.7. Concentração**

A concentração espermática representa o número de espermatozóides por mL, variando nos caprinos de 1 a 6 bilhões/mL (MIES FILHO, 1987; HAFEZ, 2004), ficando geralmente em torno de 3 bilhões/mL (NUNES, 2002).

O procedimento mais comum para se obter a concentração espermática consiste na contagem das células na câmara de Neubauer; porém, pode-se utilizar a espectrofotometria (CBRA, 1998).

## 2.6. Características morfológicas do sêmen

A análise da morfologia do sêmen consiste na classificação dos espermatozóides segundo a presença ou ausência de patologias. O exame morfológico auxilia na avaliação da qualidade seminal por determinar a percentagem de espermatozóides com defeitos no ejaculado, os quais não devem ultrapassar 15% (NUNES, 2002) ou 30% (CBRA, 1998).

Um dos métodos utilizados para avaliação da morfologia espermática é a contagem de 200 células espermáticas mortas, fixadas ou não, em uma preparação úmida em lâmina, com aumento de 1000X (imersão) em microscópio de luz.

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) é o órgão que regulamenta o exame andrológico e a avaliação do sêmen animal no Brasil. Em seu manual, elaborado em 1998, preconiza-se que para se utilizar um sêmen caprino descongelado, ele deve obter, no mínimo, os padrões seminais apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Características físicas do sêmen descongelado para bodes doadores (palhetas de 0,25 mL)

Parâmetros	Valores
Motilidade (0-100 %)	30 %
Vigor (0-5)	2
Espermatozóides normais	80 %
Número de espermatozóides com motilidade progressiva	$40 \times 10^6$ spz/mL por dose

Fonte: CBRA, 1998.

As anormalidades morfológicas dos espermatozóides apresentam à mais alta correlação (negativa) com a fertilidade dos rebanhos (HAFEZ, 2004), uma vez que pode interferir na motilidade progressiva e na capacidade de ligação à zona pelúcida.

## **2.7. Exames complementares do sêmen**

### **2.7.1. Teste de termorresistência (TTR)**

As células germinativas masculinas têm um período de vida limitado após sair do trato reprodutivo do macho. Após a monta e deposição do sêmen no trato genital da fêmea, os espermatozóides começam a se movimentar a procura do oócito. A fêmea auxilia na movimentação dos espermatozóides com as contrações dos órgãos reprodutivos, mas também os prejudica oferecendo barreiras químicas (pH na vagina, fagocitose) e físicas (cérvice, junção útero-tubárica) para evitar a poliespermia. Uma parte dos espermatozóides se concentra em reservatórios naturais na fêmea (junção útero-tubárica), diminuindo a sua motilidade devido a diminuição de cálcio e, posteriormente, são liberados e capacitados para realizar a fecundação do oócito.

Na inseminação artificial, o espermatozóide pode sofrer antecipação de sua capacitação com o processo de criopreservação e, assim, ter uma menor vida, e ou, capacidade fecundante. Portanto, a IA deve ocorrer o mais próximo do momento da ovulação para que o espermatozóide possa realizar a fecundação com sucesso.

No TTR, a capacidade de sobrevivência (motilidade e vigor) é avaliada *in vitro* colocando-se o sêmen a temperatura de 37-38°C, semelhante ao trato reprodutivo da fêmea. Na espécie caprina, utiliza-se a incubação do sêmen em banho-maria a 37°C, por duas horas, com a avaliação da motilidade e vigor aos 5, 60 e 120 minutos após o início da incubação (CAMPOS *et al.*, 2003).

O CBRA preconiza que, no mínimo, para o sêmen descongelado, o vigor seja de 2 e a motilidade 30%, na avaliação após o descongelamento.

### **2.7.2. Coloração supravital (eosina-nigrosina)**

A integridade da membrana plasmática do espermatozóide é um requisito fundamental para a sua viabilidade e conseqüente potencial de fecundação (EVANS e MAXWELL, 1990; HAFEZ, 2004).

A ocorrência de possíveis alterações na membrana plasmática após a congelação e descongelação pode ser avaliada por meio de colorações supravitais.

Esta coloração avalia diretamente a integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça do espermatozóide e, geralmente, utiliza como corante a eosina ou esta combinada com nigrosina (EVANS e MAXWELL, 1990).

A ação dos corantes depende da integridade das membranas, ou seja, quando a mesma está íntegra o corante não a ultrapassa e, assim, não chega ao compartimento nuclear (núcleo não corado). Por outro lado, caso a membrana esteja lesionada, o corante passa por ela e cora o núcleo. Essa técnica também é conhecida como “coloração de vivos e mortos”, já que as células espermáticas com membranas lesionadas (mortas) serão coradas e aquelas que estão íntegras não (GARNER *et al.*, 1986).

### **2.7.3. Teste de ligação do espermatozóide à membrana da gema de ovo**

A penetração da zona pelúcida (ZP) é um dos eventos essenciais para a fecundação. Ela acontece após a capacitação do gameta masculino e sua interação (contato) com o gameta feminino, permitindo que ocorra a reação acrossomal e fertilização (MAYENCO-AGUIRRE e PÉREZ-CORTES, 1998).

A zona pelúcida é composta por glicoproteínas, sendo que a ZP3 tem a função de reconhecer os espermatozoides e a ZP2 de manter a ligação espermatozóide-zona pelúcida depois de ocorrer a reação acrossomal (BLEIL e WASSARMAN, 1980). Convém lembrar que a zona pelúcida funciona como um receptor espécie-específico de espermatozoides capacitados; porém, o código genético das ZP2 e ZP3 é conservado na maioria dos mamíferos e, assim, existe similaridade entre as sequências de aminoácidos (RINGUETE *et al.*, 1986).

Como a fertilização é intimamente dependente da interação entre os gametas, Olar (1984) relata que a avaliação da capacidade do espermatozóide fecundar um ovócito após o descongelamento poderia ser considerada um parâmetro mais importante que a observação da motilidade durante um período de incubação (TTR). No entanto, os parâmetros preconizados para indicar a

fertilidade de um macho ainda são a motilidade, morfologia e concentração espermática (CBRA,1998).

Verificar a habilidade do espermatozóide em se ligar a zona pelúcida (capacidade fecundante) pode ser considerado um valioso teste na análise da eficácia do processo de criopreservação do sêmen (BARBATO *et al.*, 1998). Este teste já foi estudado em muitas espécies domésticas: suínos (FAZELLI *et al.*, 1995), eqüinos (FAZELLI *et al.*, 1993a), bovinos (FAZELLI *et al.*, 1993b) e caprinos (SANTOS, 2010).

Outra vantagem de se realizar o teste de ligação e penetração da zona pelúcida está em avaliar indiretamente os eventos bioquímicos relacionados à fertilização (capacitação e reação acrossômica), os quais possuem mensurações mais complexas (AMORIM *et al.*, 2008).

Em relação à fertilização “in vitro”, o teste de ligação é mais rápido, pois não é necessário maturar o oócito e avaliar o desenvolvimento embrionário, mas sim avaliar a ligação/penetração do espermatozóide na membrana do oócito. Esse teste pode ser realizado por microscopia de fluorescência (corante de Hoechst 33258) ou por microscopia de luz (corante acetato deorceína) (HEWITT e ENGLAND, 1997).

Similaridades entre as glicoproteínas da zona pelúcida de muitos mamíferos e da membrana perivitelina da gema do ovo de galinha permitem a ligação dos espermatozóides a esta membrana (BARBATO *et al.*,1998; CHISTILIS, dados ainda não publicados).

Assim, como uma técnica simples e rápida, este teste de ligação pode ser utilizado para identificar a subfertilidade de machos (BARBATO *et al.*, 1998) ou avaliar danos causados aos espermatozóides no processo de criopreservação do sêmen (AMANN *et al.*, 1999).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Localização**

O estudo foi realizado no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, que tem como coordenadas geográficas o paralelo de 20°45'14'', latitude S, e o

meridiano de 42°52'54'', longitude W Gr., altitude média de 752,5 m, temperatura média anual de 19°C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm e clima do tipo tropical úmido (Fonte: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre, 2010). O período experimental foi de março a maio de 2010, quando os animais se encontravam no período de estação reprodutiva.

### **3.2. Animais e alimentação**

Foram selecionados como doadores de sêmen dois reprodutores caprinos adultos, com 4 anos de idade, da raça Parda Alpina, mantidos em baias individuais, clinicamente sadios e com histórico de fertilidade normal. Antes do período experimental, os animais foram submetidos a exame andrológico de acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Os animais receberam alimentação volumosa composta de silagem de milho e concentrado protéico, bem como sal mineral e água *ad libitum*, atendendo às exigências nutricionais da categoria.

### **3.3. Coletas de sêmen**

O sêmen dos animais foi coletado com intervalo de um dia entre as coletas, durante o período da manhã, entre os meses de março e abril de 2010. Foram coletados 8 ejaculados por animal, utilizando como manequins fêmeas que estavam na fase de estro, colocadas em tronco próprio para a espécie caprina.

Para a coleta do sêmen foi utilizada a técnica da vagina artificial (Figura 1) de modelo curto (MIES FILHO, 1987), aquecida com água a 40-42°C. Como revestimento da mucosa da vagina artificial foram utilizados sacos plásticos em forma de funil, onde na extremidade mais fina foi acoplado um tubo de centrífuga graduado de plástico (15 mL). Esse mesmo tubo foi revestido externamente com papel alumínio para evitar o contato do sêmen com a luz que é espermicida. Rapidamente, o tubo com sêmen foi encaminhado ao laboratório, para ser analisado e processado.



Figura 1: Vagina artificial utilizada para coleta de sêmen nos bodes (modelo artesanal).

### 3.4. Análises físicas do sêmen

Os tubos de coleta de sêmen ficaram em suportes sobre a bancada do laboratório, em temperatura ambiente, juntamente com o diluente Glicose-EDTA gema de ovo de MARTIN *et al.* (1979) modificado por BISPO (2009), o qual foi retirado do banho-maria (37°C) assim que o sêmen coletado chegou ao laboratório.

Todo material utilizado na avaliação do sêmen foi previamente aquecido em duas placas aquecedoras reguladas 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 inferido valor de acordo com escalas pré-definidas para aspecto (1: aquoso, 2: leitoso, 3: cremoso) e coloração (1: branca, 2: branco-amarelada, 3: amarelada).

O turbilhonamento foi avaliado por meio da deposição de uma gota de sêmen (10 µL) em uma lâmina, observando em microscópio de luz no 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 massa.

Em uma lâmina escavada foi colocado 10 µL do sêmen e 100 µL do diluente, que depois de homogeneizado, foi retirada uma alíquota de 10 µL para realizar a avaliação da motilidade e vigor. A observação foi feita em

microscópio de luz, no aumento de 200X, utilizando-se lâminas e lamínulas pré-aquecidas.

No parâmetro motilidade foram atribuídas notas percentuais subjetivas de 0 a 100% em relação à quantidade de espermatozóides 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 frasco ependorfe de 1,5 mL, adicionando posteriormente 200 µL do diluente Glicose-EDTA gema de ovo (MARTIN *et al.*, 1979, modificado por BISPO, 2009), e incubando a 37°C por período de 180 minutos. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados pelo TTR nos tempos de 5, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos.

Para realização da concentração espermática, uma alíquota de 20 µL do sêmen foi diluída em 4 mL de água. Posteriormente, uma alíquota de 20 µL da mistura sêmen:água foi colocado em uma câmara de Neubauer e o número de células espermáticas foi quantificado. Por meio da fórmula abaixo, foi estimada a concentração total do ejaculado:

$$\frac{n}{1/10^* \times 5/25^{**} \times 1/200^{***}}$$

n= número de espermatozóides contados em 5 campos da câmara de Neubauer;

\* = distância entre a lâmina e a lente objetiva do microscópio de luz;

\*\*=número de quadrados contados sobre o total existente na câmara de Neubauer;

\*\*\*= fator de diluição.

O valor é encontrado em cm<sup>3</sup> (espermatozóides/cm<sup>3</sup>). Para o valor em mL é necessário multiplicá-lo por 1000 (espermatozóides/mL).

Para a análise morfológica, 50 µL de sêmen fresco foi colocado em um ependorfe contendo 0,5 mL de formol-salino tamponado, sendo o ependorfe reservado para posterior análise em microscopia de contraste de fase (aumento de 1000X). Foram contabilizadas 200 células por cada ejaculado, verificando-se os percentuais de defeitos espermáticos segundo os critérios adotados por BLOM (1973) em defeitos maiores e menores. Os resultados

foram classificados de acordo com os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

### 3.5. Diluição do sêmen

O tubo que continha o diluente Glicose-EDTA gema de ovo (MARTIN *et al.*, 1979, modificado por BISPO, 2009) foi retirado do banho-maria e colocado sobre a bancada do laboratório (temperatura ambiente), juntamente com o sêmen recém-coletado. Após as avaliações físicas e cálculo da concentração do ejaculado, o diluente foi adicionado à amostra de sêmen para uma concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozóides por mL.

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

### 3.6. Resfriamento do sêmen

As palhetas foram colocadas em tubos de ensaio de vidro (15 mL) fechado, os quais foram acondicionados em mamadeiras plásticas (240 mL) contendo 120 mL de álcool absoluto (Figura 2), e mantidos em temperatura ambiente. Logo após, o conjunto foi levado ao interior de uma geladeira, permanecendo na posição horizontal em temperatura de 5°C, por uma hora, seguindo a curva de resfriamento (45 minutos) e tempo de equilíbrio (15 minutos), como descrito por Furst (2002).

Após terem transcorridos os 60 minutos de resfriamento, uma palheta foi retirada da mamadeira, reaquecida a 37°C e realizada a análise de motilidade e vigor, enquanto as outras foram direcionadas ao congelamento.

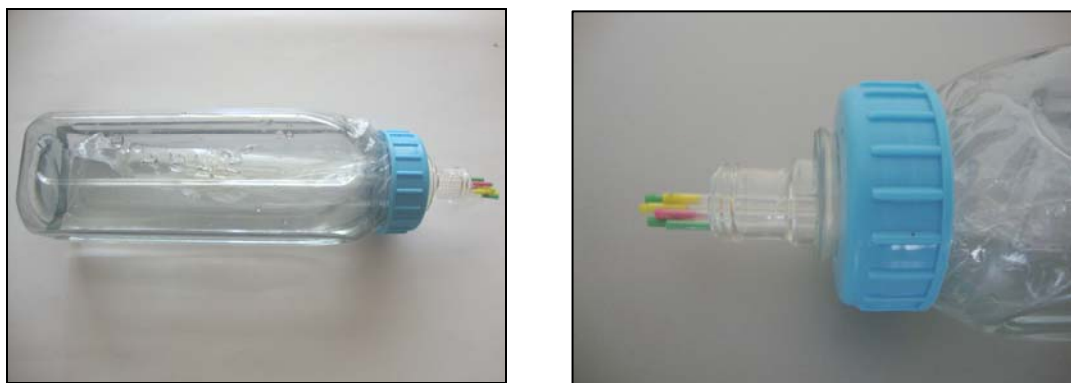


Figura 2: Tubos de ensaio nas mamadeiras contendo as palhetas envasadas com o sêmen diluído.

### **3.7. Congelamento do sêmen**

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

### **3.8. Delineamento experimental**

Foram realizadas oito coletas (partidas) nos dois animais, totalizando 16 partidas no final do experimento. Em cada partida, foram realizados os testes e análises para cada um dos quatro tratamentos (controle, Ringer lactato, citrato de sódio 2,92% e TRIS).

Os ejaculados após serem diluídos no meio Glicose-EDTA (MARTIN *et al.*, 1979 modificado por BISPO, 2009) foram envasados em palhetas de 0,25 mL com concentração de 50 milhões de espermatozoides/mL e congelados em nitrogênio líquido (-196°C). Os diluentes Ringer com lactato, citrato de sódio 2,92% e solução TRIS foram aliquotados em ependorfes no volume de 0,25 mL cada, sendo também criopreservados no mesmo botijão. No momento da análise, os ependorfes foram descongelados juntamente com as palhetas de sêmen a 37°C/30 segundos. As palhetas de sêmen descongeladas de cada partida e de cada bode foram transferidas aos ependorfes, e após 5 minutos, realizou-se as análises físicas (motilidade e vigor) e os testes complementares (TTR, supravital e teste de ligação).

### **3.9. Diluentes utilizados**

Todos os diluentes utilizados neste estudo são apresentados nas Tabelas de 2 a 7.

Tabela 2 - Composição da solução 1 para produção do meio Glicose-EDTA gema de ovo (MARTIN *et al.*, 1979 modificado por BISPO, 2009).

Constituintes	Martin <i>et al.</i> , 1979	Bispo, 2009
Glicose	6,0 g	6,0 g
Citrato de sódio diidratado	0,375 g	0,375 g
EDTA dissódico	0,37 g	0,37 g
Bicarbonato de sódio	0,12 g	0,12 g
Água destilada	100 mL	100 mL
Gentamicina	0,8 mg/100 mL	0,8 mg/100 mL

Fonte: BISPO (2009).

Tabela 3 - Composição da solução 2 para produção do meio Glicose-EDTA gema de ovo (MARTIN *et al.*, 1979 modificado por BISPO, 2009).

Constituintes	Martin <i>et al.</i> , 1979	Bispo, 2009
Solução Lactose a 11 %	50 mL	50 mL
Solução de citrato de sódio a 3 %	0 mL	17,5 mL
<i>Solução 1</i>	25 mL	26 mL
Gema de ovo	20 mL	2,5 mL
Orvus es paste®	0,5 mL	0,5 mL
Glicerol (5 %)	5 mL	5 mL

Fonte: BISPO (2009).

Tabela 4 – Composição do meio diluente Ringer com Lactato (Equiplex®).

Constituintes	Quantidades
Lactato de sódio	0,3 g
Cloreto de sódio	0,6 g
Cloreto de potássio	0,03 g
Cloreto de cálcio diidratado	0,02 g
Água q.s.p	100 mL

Fonte: EQUIPLEX.

Tabela 5 – Composição do meio diluente Bull Media – TALP (B-TALP)

Constituintes	Quantidades
NaCl	0,569 g
KCl	0,023 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,004 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,209 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (adicionar no final)	0,025 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,008 g
Na Piruvato	0,0022 g
Na Lactato	0,368 mL
Glicose	0,090 g
HEPES	0,238 g
BSA	0,300 g

Fonte: CHRISTILIS (2010) ; OBS.: ajustar osmolaridade (300-310 mOsm) e pH (7,2-7,4)

Tabela 6 – Composição do meio diluente citrato de sódio 2,92 %

Constituintes	Quantidades
Citrato de sódio	2,92 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Fonte: AISEN (2008)

Tabela 7 – Composição do meio diluente TRIS

Constituintes	Quantidades
Tris (N-Tris [hidroximetil] aminometano)	2,71 g
Ácido cítrico anidro	1,40 g
Frutose	1 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Fonte: AISEN (2008)

### **3.10. Descongelamento e análises do sêmen**

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, por 30 segundos e, posteriormente, secas em papel toalha. A seguir, todas as partidas de sêmen descongeladas foram misturadas aos quatro meios testados.

A longevidade dos espermatozóides foi avaliada pelo teste de termorresistência (TTR), que se consistiu em colocar uma amostra de sêmen de 0,25 mL em frasco ependorfe de 1,5 mL contendo um dos diluentes testados (Ringer com Lactato, TRIS ou Citrato de Sódio), e incubando-o a 37°C por um período de 180 minutos. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados pelo TTR nos tempos de 5, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos.

Para observação da motilidade e do vigor, os procedimentos adotados foram os mesmos descritos anteriormente para análise do sêmen fresco. No tempo de cinco minutos também foram retiradas alíquotas do sêmen para análise da morfologia (fixadas em solução de formol salina), para o teste de ligação e para o teste de integridade de membrana (coloração supravital).

#### **3.10.1. Coloração supravital**

A coloração supravital foi realizada com 10 µL do corante eosina-nigrosina misturado com 10 µL de sêmen e homogeneizado a 37°C. Na sequência, foi realizado um esfregaço em lâmina para leitura em microscópio de luz com aumento de 400X. Foram contadas 200 células e consideradas normais aquelas células que não se coraram, enquanto que as coradas de róseo foram consideradas lesadas.

#### **3.10.2. Teste de ligação do espermatozóide a membrana da gema de ovo**

A membrana perivitelina foi preparada separando a gema da clara do ovo, e removendo o excesso de clara usando papel toalha. A gema intacta foi colocada sobre um filme plástico, e a membrana foi delicadamente rompida e lavada usando a solução B-TALP. A seguir, a membrana foi retirada do filme plástico, colocada em uma placa de Petri e lavada várias vezes com solução B-TALP até que a solução estivesse limpa.

Utilizando uma cubeta de espectrofotômetro como molde, a membrana foi cortada em pequenos quadrados ( $1 \text{ cm}^2$ ) após ser espalhada delicadamente na placa de Petri. Cada pedaço foi transferido para um tubo de cultura (10 mL) contendo 1 mL de B-TALP.

Após terem transcorridos os cinco minutos do descongelamento das palhetas de sêmen no ependorfe e sido adicionadas as soluções (TRIS, Ringer com lactato, citrato de sódio 2,92%) de acordo com os tratamentos, foi retirada uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  do ependorfe, com concentração de  $6,25 \times 10^6$  espermatozóides/mL, e transferida para os tubos de cultura que continham um quadrado da membrana.

As membranas com os espermatozóides foram incubadas, por uma hora a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Depois de transcorridos os primeiros 30 minutos, o tubo foi agitado suavemente e adicionou-se 3  $\mu\text{L}$  do corante acetato de orceína para corar os espermatozóides, voltando para incubação por mais 30 minutos. Finalizando a fase de incubação, as membranas foram colocadas em um tubo de cultura e lavadas cinco vezes com solução B-TALP para a retirada dos espermatozóides que não se aderiram.

A membrana foi colocada sobre uma lâmina e delicadamente espalhada com auxílio de uma agulha para remoção de possíveis dobras. Logo em seguida, as membranas foram cobertas com lamínulas e examinadas utilizando microscópio de contraste de fase com aumento de 400X.

Foram observados os espermatozóides aderidos à membrana e contados todos aqueles que estavam presentes em seis microcampos escolhidos aleatoriamente, estimando, assim, o percentual segundo Barbatto *et al.* (1998).

#### **4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Para análise estatística, as variáveis foram submetidas aos testes de normalidade (teste de Lilliefors) e homocedasticidade (teste de Cochram & Bartlett) e, posteriormente, à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para aquelas que apresentaram significância.

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

O programa utilizado para as análises estatísticas foi o SAEG, versão 9.1 (UFV, 2007).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Sêmen fresco

O volume seminal de caprinos varia de 0,2 a 2 mL (NUNES, 2002; HAFEZ, 2004), sendo mais observados volumes entre 0,7 e 1,1 mL para animais da raça Saanen e de 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). No presente estudo, foi observado que a variável volume do ejaculado de  $1,03 \pm 0,04$  mL (Tabela 8) ficou dentro dos intervalos anteriormente citados e, também, dentro do recomendado pelo CBRA (1998), que é de no mínimo 0,8 mL.

Os ejaculados foram classificados neste trabalho, quanto ao aspecto, em aquoso (0%), leitoso (87,5%) e cremoso (12,5%) (Tabela 8), estando de acordo com Hafez (2004). De acordo com a metodologia utilizada, para o parâmetro coloração foi feita a classificação com três valores (1= branca; 2= branco-amarelada; e 3= amarelada). Contudo, a coloração branca não foi encontrada nas avaliações realizadas nos ejaculados, predominando as cores amarelada (31,2%) e branco-amarelada (68,8%). Nos caprinos, o sêmen se apresenta naturalmente mais amarelado (HAFEZ, 2004) e, na maioria das vezes, é devido a presença do plasma em grande quantidade.

Segundo os autores Mies Filho (1987), Chemineau *et al.* (1991) e Hafez (2004), o aspecto e a coloração do sêmen de ruminantes pode ser indicador da concentração de espermatozóides. Santos *et al.* (2001) não verificaram variações no aspecto seminal durante cinco meses de avaliação em bodes Saanen, os quais apresentaram sempre cremosos, estando relacionados com uma elevada concentração espermática. Assim, quanto menos aquoso e maior coloração branca (menos plasma), maior será a concentração de espermatozóides (HAFEZ, 2004).

Neste trabalho, o turbilhonamento teve uma média de  $3,22 \pm 0,07$  e a concentração  $3,33 \pm 0,2$  bilhões de espermatozóides/mL (Tabela 1), sendo considerados dentro do esperado e recomendado pelo CBRA (1998). De acordo com Mies Filho (1987) e Castelo *et al.* (2008), a concentração de espermatozóides na espécie caprina varia de 1,0 a 5,0 bilhões de

espermatozoides/mL, sendo a média 3,0 bilhões. Para Hafez (2004) a concentração em caprinos se apresenta variando de 2,5 a 5,0 bilhões de espermatozoides/mL.

Tabela 8 – Médias e desvios-padrão para volume, aspecto dos ejaculados, coloração, concentração e turbilhonamento do sêmen fresco.

Parâmetros	Médias ± s
Volume	1,03 ± 0,04 mL
Aspecto dos ejaculados	
Aquoso	0 %
Leitoso	87,5 %
Cremoso	12,5 %
Coloração	
Amarelada	31,2 %
Branco-amarelada	68,8 %
Branca	0 %
Concentração	3,33 ± 0,2 bilhões/mL
Turbilhonamento (0-5)	3,22 ± 0,07

Foi encontrada correlação positiva entre a concentração e turbilhonamento ( $r = +0,52$ ,  $P < 0,05$ ), mostrando-se que quanto maior a concentração do sêmen ejaculado, maior a quantidade de espermatozoides nas ondas de movimentação.

A motilidade do sêmen fresco obtida no experimento ( $83,13 \pm 0,54\%$ , Tabela 3) apresentou-se acima do valor mínimo exigido pelo CBRA (70%) para o sêmen caprino a fresco. Da mesma forma, o vigor espermático apresentou valor médio ( $3,94 \pm 0,08$ ) superior ao valor mínimo preconizado. Esses parâmetros físicos de motilidade e vigor são próximos àqueles encontrados por Bispo (2005), que foram de  $82,33 \pm 9,79\%$  e  $3,93 \pm 0,41$ , e por Betini *et al.* (1998), que foram de  $86,00 \pm 1,08\%$  e  $3,66 \pm 0,11$ , respectivamente.

Uma queda pôde ser observada na motilidade e vigor dos espermatozoides após o resfriamento; porém, isso poderia ser esperado, visto que, o processo de criopreservação pode alterar e, ou, danificar as membranas plasmáticas, inviabilizando assim, parte dos espermatozoides (FÜRST, 2006). Também deve considerar que as amostras para a análise do sêmen resfriado

foram retiradas após o mesmo passar pelo tempo de equilíbrio (temperatura de 5°C). Logo, os espermatozóides estavam com a motilidade normalmente reduzida (McKINNON, 1996; FÜRST, 2006).

Tabela 9 – Médias e desvios-padrão para motilidade, vigor e morfologia do sêmen fresco.

Parâmetros	Médias ± s
Motilidade (0-100%)	
Sêmen fresco	83,13 ± 0,54%
Sêmen fresco resfriado	72,33 ± 1,11%
Vigor (0-5)	
Sêmen fresco	3,94 ± 0,08
Sêmen fresco resfriado	3,33 ± 0,05
Morfologia (%)	
Normais	90,77 ± 0,85%
Defeitos Maiores	0,17 ± 0,33%
Defeitos Menores	9,09 ± 6,00%

A morfologia espermática do sêmen fresco foi resumida em normais, defeitos maiores e menores (Tabela 9), sendo que os defeitos menores apresentaram em maior percentagem que os defeitos maiores. No entanto, pode-se notar que a anormalidade total foi baixa (menos de 30%), como estabelecido pelo CBRA (1998).

## 5.2. Sêmen descongelado

Na tabela 10 são apresentados os valores para motilidade e vigor do sêmen descongelado no teste de termorresistência (TTR) comparados entre os quatro tratamentos utilizados.

Tabela 10 – Médias e desvios- padrão para motilidade (MOT - %) e vigor (VIG - 0-5) no teste de termorresistência (37 °C) do sêmen descongelado nos tratamentos experimentais e em função do tempo (minutos).

Tratamentos	5 minutos		30 minutos		60 minutos		90 minutos	
	MOT	VIG	MOT	VIG	MOT	VIG	MOT	VIG
Grupo controle	42,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	16,6 ± 3,0 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,3 ± 1,3 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>
Solução TRIS	32,8 ± 1,4 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	22,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	10,9 ± 2,5 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,8 ± 2,00 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
Ringer Lactato	30,9 ± 1,5 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	11,0 ± 2,2 <sup>c</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,7 ± 1,7 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>
Citrato de Sódio 2,92%	26,3 ± 2,4 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,9 ± 1,4 <sup>d</sup>	0,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	0,6 ± 0,6 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>
Médias ± s	33,1 ± 1,8	3,0 ± 0,1	12,9 ± 2,2	1,3 ± 0,2	3,9 ± 1,5	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,5	0,1 ± 0,1

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

A maior parte dos parâmetros do sêmen analisado na pós-descongelção atendeu às normas do CBRA (Tabela 11) no início do TTR (Tabela 10 - Tempo 5'). Em todos tratamentos, a concentração ficou abaixo do preconizado, visto que, no processo de congelamento foi usada como padrão a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e após a descongelamento houve perda de motilidade, levando a perda de espermatozoides móveis em todos os tratamentos.

Tabela 11 – Valores mínimos preconizados pelo CBRA para bodes doadores de sêmen (pós-descongelamento, palhetas de 0,25 mL).

Parâmetros	Valor
Motilidade	30%
Vigor	2
Espermatozoides normais	80 %
Número de espermatozoides com motilidade progressiva	$40 \times 10^6$ sptz/mL por dose

Fonte: CBRA, 1998.

O período de sobrevivência do sêmen não ultrapassou 90 minutos após o descongelamento (Tabela 10). Apesar de o controle ter, aos 5 minutos pós-descongelamento, maior motilidade ( $P < 0,05$ ), esta diminuiu rapidamente com o passar do tempo. Os outros tratamentos já iniciaram o TTR com uma motilidade menor que a do controle; porém, pode-se observar que o tratamento com solução TRIS apresentou maior persistência e diminuição menos abrupta dos parâmetros motilidade e vigor, em relação aos outros tratamentos. Porém, em todos os tratamentos, após 30 minutos, os parâmetros estavam aquém do indicado pelo CBRA (1998).

Bispo (2009) utilizando o mesmo diluente Glicose-EDTA (MARTIN *et al.*, 1979 modificado por BISPO, 2009) obteve valores maiores ( $61,2 \pm 5,1$  %) que o encontrado para motilidade neste trabalho. Porém, o autor não realizou o TTR após o descongelamento impedindo-se realizar melhores comparações. Quanto ao vigor, os valores encontrados por BISPO (2009) ( $3,1 \pm 0,2$ ) estão próximos daqueles apresentados por este trabalho.

Rovay (2006), utilizando um diluente à base de gema de ovo (leite desnatado-gema) (MIES FILHO, 1987), também encontrou em seu trabalho com sêmen caprino comportamento semelhante da motilidade ao TTR, permanecendo alta nos primeiros 30 minutos do teste e caindo na primeira hora.

Diante disso, podem-se levantar as seguintes hipóteses: os espermatozoides neste estudo podem não ter sido suficientemente protegidos pelo diluente Glicose-EDTA (MARTIN *et al.*, 1979 modificado por BISPO, 2009) dos danos causados pelo processo de criopreservação, ou sofreram capacitação antecipada. Assim, apesar de apresentar motilidade e vigor após a descongelamento, as membranas estavam alteradas a ponto dos espermatozoides não suportarem período maior de incubação ( $37^{\circ}\text{C}$ ) e morrerem (TTR).

Sabe-se, que após a IA ou monta natural, os espermatozoides são auxiliados no trato reprodutivo feminino, com contrações musculares e nutrientes, para chegarem ao encontro do oócito no oviduto. Por esse motivo, mesmo que os espermatozoides diminuam a sua motilidade e vigor com o passar do tempo é possível fecundarem, caso não ocorra a cobertura muito

distante do momento da ovulação. Portanto, testes *in vivo* seriam necessários para auxiliar na confirmação ou não da eficácia deste trabalho.

Uma possível explicação para a solução TRIS ter permitido persistência e diminuição menos abrupta dos parâmetros motilidade e vigor pode ser devido ao aumento de volume e diluição dos elementos que poderiam estar sendo tóxicos aos espermatozóides. Também se pode considerar a presença de frutose na solução de TRIS adicionada. Esse açúcar é utilizado pelos espermatozóides como substrato energético (MANN, 1974; GONZALES *et al.*, 1984), podendo aumentar a vida das células espermáticas.

Considera-se ainda a ação tamponante do ácido cítrico, e também do Tris (hidroximetil)-aminometano (SALVIANO *et al.*, 2008) realizando a manutenção do equilíbrio osmótico. O TRIS tem maior poder tampão que o fosfato ou o citrato, podendo ultrapassar a membrana plasmática e também reduzir as variações intracelulares do pH (SALAMON e MAXWELL, 2000). Trabalhos com sêmen caprino utilizando o diluidor TRIS contendo gema de ovo, obtiveram bons resultados *in vitro* (VIANA *et al.*, 2006; BRITO, 2008; SILVA, 2009).

Silva (2009) sugere que o diluente à base de TRIS com gema de ovo pode interferir no meio, bloqueando ou minimizando o efeito deletério do plasma seminal sobre as células espermáticas de caprinos. Segundo Al Somai *et al.* (1994), as proteínas do plasma seminal em ruminantes são encontradas em agregados protéicos de alto peso molecular, os quais na presença de citrato e em condições ácidas, separam-se em moléculas protéicas de baixo peso molecular que são prejudiciais a motilidade espermática. O metabolismo dos espermatozóides gera íons de hidrogênio e ácido láctico no meio extracelular, que além de poder causar a morte de células espermáticas, diminui o pH do meio. Segundo Silva (2009), como o TRIS é um tampão, pode não permitir o desenvolvimento de um pH capaz de expressar o efeito deletério à motilidade espermática de algumas proteínas presentes no plasma seminal.

Dentre os tratamentos, aquele em que foi adicionado a solução de citrato de sódio 2,92%, apresentou os menores valores de motilidade e vigor ( $P < 0,05$ ) desde o tempo de cinco minutos. Segundo Al Somai *et al.* (1994), o citrato pode permitir a ativação de proteínas que diminuem a motilidade do sêmen.

Na tabela 12 são apresentados os valores médios e desvios-padrão para a motilidade e vigor no teste de termorresistência do sêmen fresco, realizado após a coleta do ejaculado.

Tabela 12 – Médias e desvios-padrão para motilidade (%) e vigor (0-5) no teste de termorresistência (TTR) do sêmen fresco em função do tempo (min.).

Sêmen fresco	5 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.
Motilidade	81,9 ± 0,9	68,1 ± 1,3	46,9 ± 1,5	29,3 ± 2,4	19,3 ± 2,0	13,0 ± 1,9	5,5 ± 1,0
Vigor	3,4 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1

Diferente do sêmen descongelado, o sêmen fresco atingiu o tempo de 180 minutos ainda com motilidade e vigor, apesar de nos últimos 60 minutos também apresentar valores reduzidos para estes parâmetros (Tabela 10).

Correlação positiva ( $r = +0,50$ ) e negativa ( $r = -0,50$ ) ( $P < 0,05$ ) entre a motilidade aos cinco minutos do sêmen fresco e a porcentagem de espermatozóides normais e com defeitos menores, respectivamente, vem confirmar que quanto menos patologias o sêmen apresentar maior será a sua movimentação progressiva.

O vigor obtido no início da avaliação do ejaculado pode dar indicações de como está e como será a viabilidade do sêmen. Correlações positivas foram encontradas entre vigor e motilidade no TTR do sêmen fresco aos cinco minutos ( $r = +0,66$ ), trinta minutos ( $r = +0,43$ ) e sessenta minutos ( $r = +0,24$ ) ( $P < 0,05$ ). Assim, quanto maior o vigor do sêmen recém-ejaculado, maior será o tempo de vida dos espermatozóides.

Os testes complementares realizados neste trabalho apresentaram resultados semelhantes, não apresentando diferenças entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ). Na Tabela 13 são apresentados os valores para a coloração supravital, teste de ligação e morfologia (normais, defeitos maiores e menores) do sêmen descongelado, comparando-se os quatro tratamentos utilizados.

Tabela 13 - Médias e desvios-padrão para os testes de coloração supravital, de ligação e morfológico dos espermatozóides, entre tratamentos experimentais.

Tratamentos	Supravital (%)	Teste de Ligação*	Morfologia (%)	
			Def. Maiores	Def. Menores
Controle	38,53 ± 9,33 <sup>a</sup>	253,31 ± 156,2 <sup>a</sup>	5,32 ± 3,48 <sup>a</sup>	6,33 ± 3,66 <sup>a</sup>
Solução TRIS	37,09 ± 8,73 <sup>a</sup>	236,47 ± 164,24 <sup>a</sup>	6,00 ± 4,08 <sup>a</sup>	9,47 ± 5,41 <sup>a</sup>
Ringer lactato	36,00 ± 11,58 <sup>a</sup>	165,00 ± 165,22 <sup>a</sup>	5,84 ± 3,28 <sup>a</sup>	7,24 ± 7,15 <sup>a</sup>
Citrato de sódio 2,92%	33,84 ± 11,88 <sup>a</sup>	205,13 ± 132,5 <sup>a</sup>	5,68 ± 3,98 <sup>a</sup>	4,77 ± 7,45 <sup>a</sup>
Médias ± s	36,37 ± 10,38	202,98 ± 154,54	5,71 ± 3,71	6,95 ± 5,92

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey;

\* números de espermatozóides contados nos 6 campos.

Não foi encontrada influência dos tratamentos ( $P > 0,05$ ) no teste que analisou a integridade de membranas (teste supravital). Independente do tratamento, o número de células não coradas (membrana íntegra) foi semelhante ( $P > 0,05$ ). No entanto, na Tabela 14 é realizada uma comparação da motilidade e vigor do sêmen descongelado (cinco minutos do TTR) com o teste supravital, podendo ser observado que o citrato de sódio foi o que apresentou menor percentagem de células íntegras, confirmando a baixa motilidade.

No teste de ligação do espermatozóide caprino à membrana da gema de ovo não foi encontrada diferença entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) (Tabela 13). Assim, a capacidade de ligação à membrana perivitelina foi semelhante entre os tratamentos.

A interação do espermatozóide com zona pelúcida e a penetração no ooplasma mostraram-se intimamente associadas à motilidade espermática (HAY *et al.*, 1997). No presente trabalho, as correlações encontradas foram positivas para motilidade e vigor ( $r = +0,30$  e  $r = +0,38$ , respectivamente) ( $P < 0,05$ ). Assim, quanto maior a movimentação e velocidade, maior é a capacidade de ligação dos espermatozóides ao oócito.

Tabela 14 – Médias e desvios-padrão para motilidade (%), vigor (0-5) e teste supravital (% de células íntegras) do sêmen descongelado, entre os tratamentos.

Tratamentos	Motilidade (5 min.)	Vigor (5 min.)	Supravital *
Controle	42,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	38,53 ± 9,33 <sup>a</sup>
Solução TRIS	32,8 ± 1,4 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	37,09 ± 8,73 <sup>a</sup>
Ringer lactato	30,9 ± 1,5 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	36,00 ± 11,58 <sup>a</sup>
Citrato de sódio 2,92%	26,3 ± 2,4 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	33,84 ± 11,88 <sup>a</sup>
Media ± S <sub>x</sub>	33,1 ± 1,8	3,0 ± 0,1	36,37 ± 10,38

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

\* = a alíquota de sêmen utilizada para a realização do supravital foi retirada também aos 5 minutos, do mesmo epidorfe que se realizava o TTR.

Com exceção do controle, os valores encontrados para motilidade neste trabalho estão baixos em relação aos valores observados no teste supravital. A coloração supravital é um teste quantitativo e a motilidade uma avaliação subjetiva; porém, geralmente os seus valores ficam próximos, desde que a avaliação da motilidade seja realizada com critério. Como o teste supravital avalia a integridade de membrana da célula espermática, caso esta tenha sofrido alguma alteração e esteja lesionada, é grande a probabilidade do espermatozóide estar sem motilidade. Portanto, poderia se considerar o teste supravital como uma ratificação dos valores de motilidade aferidos subjetivamente pelo pesquisador. Assim como Castilho *et al.* (2009), neste estudo foi encontrada correlação positiva de  $r = +0,39$  ( $P < 0,05$ ) entre a motilidade espermática e o teste supravital, e de  $r = +0,41$  ( $P < 0,05$ ) entre o vigor e o teste supravital. Rovay (2006) usando diluente leite desnatado-gema, também observou valores próximos entre a motilidade (49,1%) e teste de coloração supravital (44,4%).

Quanto maior a percentagem de espermatozóides normais ( $r = + 0,59$ ) e menor a percentagem de espermatozóides com defeitos menores no sêmen fresco ( $r = -0,60$ ) ( $P < 0,05$ ), maior é o número de células não coradas (íntegras) no teste supravital.

As membranas dos espermatozóides possuem diferentes regiões e, conseqüentemente, distintas estruturas e funções (WATSON, 1995). Dessa

forma, sugere-se a realização de outros testes para auxiliar na avaliação dos diferentes aspectos e regiões da membrana, e também, na sua proteção.

A realização de outras técnicas, como fluorescência, pode observar melhor a integridade da membrana e esclarecer a rápida diminuição de motilidade durante o período de incubação (37°C). As células espermáticas apresentaram motilidade após o descongelamento, porém as membranas poderiam estar alteradas e, assim, não permitirem a sobrevivência dos espermatozóides por um período maior. Somente o teste supravital é insuficiente para tal conclusão, uma vez que ele mostra aqueles espermatozóides que possuem membrana lesionada corando o núcleo, no entanto as membranas poderiam não estar totalmente danificadas, mas alteradas ao ponto de não suportarem o desafio da temperatura (37°C) por um período maior.

A realização de testes “in vivo” com o sêmen acrescido dos diluentes seria interessante para verificar se o tempo de sobrevivência apresentado a uma temperatura de 37°C é suficiente para realizar a fertilização.

A morfologia espermática foi agrupada em defeitos maiores e defeitos menores (Tabela 13). Pode-se notar que, assim como no sêmen a fresco, a totalidade dos defeitos é baixa no sêmen descongelado, próxima a encontrada por outros autores (SANTOS, 2001; FÜRST, 2002; ROVAY, 2006) e dentro dos padrões preconizados pelo CBRA (1998) que são de 20% para o sêmen descongelado. Segundo Borges (2003), a maioria dos trabalhos comprovam que não há diferença significativa na morfologia espermática após a criopreservação.

Neste estudo, verificou-se no sêmen descongelado maior frequência de caudas dobradas, caudas enroladas, caudas fortemente dobradas, deslocamento de acrossoma e cabeça isolada normal. Segundo Mies Filho (1987) e Strom *et al.* (1993) essas alterações podem ser devido ao processamento do sêmen (choque térmico) e, ou, sua criopreservação.

Foi observada, no descongelamento, correlação positiva ( $r = +0,50$ ,  $P < 0,05$ ) entre motilidade no sêmen e número de espermatozóides normais. Maior percentagem de células espermáticas sem patologias proporciona maior movimentação progressiva e, conseqüentemente, maior eficácia na fecundação. SANTOS *et al.* (2006) sugeriram que a causa de uma menor

motilidade em seu trabalho pode ter sido a maior porcentagem de patologias espermáticas encontradas ( $r = -0,74$ ).

## **6. CONCLUSÕES**

A adição das soluções Ringer Lactato, Citrato de Sódio 2,92% e Solução TRIS não permitiram uma persistência da motilidade e do vigor após o descongelamento. Apesar do tratamento em que foi utilizado a Solução TRIS ter apresentado motilidade e vigor 30 minutos a mais do que os outros tratamentos, os valores para estes parâmetros estavam abaixo do preconizado para um sêmen descongelado.

À análise morfológica do sêmen após a criopreservação não mostrou aumento das patologias espermáticas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. V. **Efeito individual e da época do ano sobre a composição do plasma seminal e a qualidade do sêmen caprino resfriado a 4 °C por 48 horas no estado do Ceará.** 2008. 122p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2008.
- AISEN, E. G. **Reprodução ovina e caprina.** São Paulo: MedVet, v.1, 203p., 2008.
- ALBERTI, K. **Congelação de semen bovino: novos enfoques em meios diluentes.** 2004. 20p. Dissertação (Monografia apresentada à disciplina de Seminário em Reprodução Animal do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2004.
- AL-SOMAI, A. N.; VISHWANATH, B. C. R.; SHANNON, B.; MOLA, C. P. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull Sperm. **Reproduction Fertility Development**, v.6, p.165-171, 1994.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; SHABANOWITZ, R. B. Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases to binding to an egg-membrane substrate. **Journal of Andrology**, v.20 (1), p. 34-41, 1999.
- AMORIM, E. A. M. **Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e eqüinos na qualidade do sêmen.** 2008. 174p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira.** São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2009.
- BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. **Biology of Reproduction**, v.58, p.686-699, 1998.
- BARBOSA, L. P. **Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen em programas de inseminação artificial em caprinos da raça Alpina.** 1999. 71p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.
- BETINI, C. M.; MORAES, G. V.; RIGOLON, C. R. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. **Acta Scientiarum**, v.20(3), p.361-365, 1998.

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.

BISPO, C. A. S. **Fertilidade do sêmen caprino resfriado ou congelado em diferentes concentrações de gema-de-ovo no diluente.** 2009. 96p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

BLEIL, J. D.; WASSARMAN, P. M. Structure and function of the zona pellucid: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucid. **Developmental Biology**, v.76, p.185–202, 1980.

BLOM, E. The ultra structure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v.25, p.383–391, 1973.

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

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

BRITO, G. B. M. **Viabilidade do sêmen caprino conservado em três diferentes diluidores: efeito da concentração inicial de frutose no plasma seminal.** 2007, 61p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2007.

CAMPOS, A. C. N.; NUNES, J. F.; MONTEIRO, A. W. U; PINHEIRO, J. H. T.; FERREIRA, M. A. L.; CRUZ, J. F. Conservação do sêmen caprino a 4°C durante o período seco e chuvoso no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27(4), p.620-624, 2003.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2(3), p.67-75, 2008.

CASTILHO, E. R.; GUIMARÃES, J. D.; MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; ESPESCHIT, C. J. B. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38(12), p.2335-2345, 2009.

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. 222p. 1991.

COELHO, L. A.; SASA, A.; NADER, C. E.; CELEGUINI, E. C. C. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58(4), p.544-549, 2006.

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

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Criopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v.48, p.831-841, 1997.

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

DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O. Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.460-462, 2001.

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(2), p.231-239, 1986.

DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v.68, p.168-177, 2007.

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.

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

EVANS, G.; MAXWEL, W. M. C. Artificial insemination of sheep and goats. **Butterworth Publishers**, v.53(4), p. 25-29, 1987.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Semen y sus características. Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, p.25. 1990.

FAHY, G. M. The relevance of cryopreservation toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v.3, p.1-13, 1986.

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

FAZELLI, A. R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M. M.; BRACHER, V.; PARLEVLIET, J.; COLENBRANDER B. Use of sperm binding to homologous hemizona pellucid to predict stallion fertility. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, v.15, p.57-59, 1993a.

FAZELLI, A. R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M. M.; DE LOOS, F. A. M.; VAN DEN BROEK, J.; COLENBRANDER, B. Development of a sperm zona pellucid binding assay for bull semen. **The Veterinary Record**, v.132, p.14-16, 1993b.

FAZELLI, A. R.; HOLT, C.; STEENWEG, W.; BEVERS, M. M.; HOLT, W. V.; COLENBRANDER, B. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. **Theriogenology**, v.44, p.17-27, 1995.

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

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

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology Reproduction**, v.24, p.127-138, 1986.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnica aplicada à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p. 15-23; 57-65; 111-23, cap. 2, 4 e 7, 2001.

GONZALES, C. I. M.; NEVES, J. P.; SILVA, C. A. M. Determinação do sódio, potássio, cálcio e magnésio no PS ovino em diferentes tempos de incubação do sêmen a + 37 °C. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.8(3), p.174-178, 1984.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. 2004. 94p. Dissertação (Doutor em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2004.

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

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

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. **Cryobiology**, v.29, p.26-38, 1992.

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Canine spermatozoa – cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v.48, p.1329-1342, 1997.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.50, p.123–139, 1997.

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

IRITANI, A. J.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg yolk coagulating enzyme in goat semen. **Japanese Journal of Zootecnical Science**, v.10(2), p.57-64, 1964.

JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35(6), p.1059-1067, 1991.

KARATZAS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S. et al. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v.48, p.1049-1059, 1997.

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

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

LUZ, S. L. N. da; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.37(2), p.10-18, 2000.

MACHADO, R. *et al.* Viabilidade econômica da inseminação artificial em caprinos. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.35(3), p.141-149, 1997.

MACHADO, R.; SIMPLICIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.19(1-2), p.61-72, 1995.

MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **Journal Reproduction and Fertility**, v.37, p. 179-188, 1974.

- MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. Centrifugation of stallion semen and its storage en large volume straws. **Journal Reproduction and Fertility**, suppl. 27, p.47-51, 1979.
- MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; SCHEFFEN, B.; ECTORS, F. Pregnancies following transfer of cattle-embryos preserved by vitification. **Cry-letters**, v.7, p.270-273, 1986.
- MAYENCO-AGUIRRE, A. M.; PÉREZ CORTÉS, A. B. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.50, p.195-204, 1998.
- McKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. **Australian Equine Veterinary Journal**, v.14, p.156-175, 1996.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.
- MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, v. 2, 701p, 1987.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull sêmen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.
- NUNES, J. F. Inseminação Artificial em Caprinos. In: GONCALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. de F. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.111-125.
- OLAR, T. T. **Cryopreservation of dog spermatozoa**. Thesis (PhD) - Colorado State University, Fort Collins, 1984.
- PARKS, E. J.; 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.
- PELLICER-RUBIO, M. T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glicoprotein with triglyceride lipase acivity. **Biology of Reproduction**, v.27(5), p.1023-1031, 1997.
- RINGUETE, M. J.; SOBIESKI, D. A.; GHAMOW, S. M; DEAN, J. Oocyte-specific gene expression: molecular characterization of a DNA codin for ZP-3, the sperm receptor of the mouse zon pellucid. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v.83, p.4341-4345, 1986.

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.

ROVAY, H. **Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos**. 2006. 56p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

SAEG. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas**. Viçosa-MG: UFV, Central de Processamento de Dados, 2007.

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.

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

SALVIANO, M. B.; SOUZA, J. A. T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32(3), p.159-167, 2008.

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(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(5), p.1926-1933, 2006.

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

SILVA, K. Q. **Efeito da adição de plasma seminal e de sua composição bioquímica sobre os espermatozoides epididimários de caprinos**. 2009. 43p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 43p.

SIMPLÍCIO, A. A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., 1989, Belo Horizonte. **Anais....** Belo Horizonte: CBRA, 1989. p.171-177

SIQUEIRA, A. P. **Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado**. 2006. 106p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 106p.

SLAVIK, T. Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.79, p.99-103, 1987.

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.

VIANA, S. K. A.; CHALHOUB, M.; FILHO, R. L. A.; ALMEIDA, K. A.; PORTELA, M. P. A.; BITTENCOURT, F. R.; GONZALEZ, G. S.; ALVES; BITTENCOURT C. C. T.; QUINTELA T. A. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**, v.7(1), p. 67-76, 2006.

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.

WATSON, P. F. Recent developments e concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, p.871-897, 1995.

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

XIMENES, L. J. F.; MARTINS, G. A.; SOBRINHO, J. N.; CARVALHO, J. M. M. **As ações do banco do nordeste do Brasil em P&D na arte da pecuária de caprinos e ovinos no nordeste brasileiro - Série BNB Ciência e Tecnologia nº 03**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 436p., 2009.