

ALESSANDRA FERREIRA DA SILVA

USO DA DIMETIL-FORMAMIDA ASSOCIADA OU NÃO AO
GLICEROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
graduação em Medicina Veterinária,
para obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2004

ALESSANDRA FERREIRA DA SILVA

USO DA DIMETIL-FORMAMIDA ASSOCIADA OU NÃO AO
GLICEROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
“Magister Scientiae”.

APROVADA: 19 de novembro de 2004

Prof. José Domingos Guimarães
(Conselheiro)

Prof. Marcelo Teixeira Rodrigues
(Conselheiro)

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres

Prof. Cláudio José Borela Espescht

Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

Mãe

Você tem a sublime capacidade de me acalantar, acalmar, acarinhar e direcionar. Assim, foi minha vida ao seu lado, sempre forte, verdadeira e comprometida com a educação em todos os sentidos, sem deixar-me esquecer do sentimento que deve mover a nossa vida: o amor ao próximo.

À você todo o meu amor, amizade e agradecimento.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado irmão, Sérgio Raniery, meu maior exemplo de coragem e honestidade.

Ao Dr. Udo Altmann, querido alemão do meu lar, pelo seu carinho e compreensão em todos os momentos.

Aos meus avós, Rita e Alberico, pela formação da minha bela família e pelos seus ensinamentos.

À paciente Regina e ao meu sobrinho, que está para chegar...

Ao Prof. Eduardo Paulino da Costa, pelos bons conselhos, oportunidade e apoio em nossos trabalhos de pesquisa e desenvolvimento.

Ao Prof. José Domingos (J.D.), pelo seu verdadeiro compromisso com a educação e orientação.

Ao Prof. Cláudio Borela, pela disponibilidade e carinho todos os momentos deste trabalho.

Ao Prof. Marcelo Rodrigues, que me recebeu como co-orientada com tanta generosidade e atenção.

Ao Prof. Dr. Hélio Blume, querido mestre da Faculdade de Medicina Veterinária-UPIS, principal responsável pelo meu desenvolvimento acadêmico.

Ao adorado técnico de laboratório, José Cândido (Seu Nenzinho), meu eterno carinho e gratidão.

Ao Vinício (Pão de queijo), pelo nosso delicioso convívio, que nos transformou em grandes e inesquecíveis amigos.

Aos meus colegas Júlio, Érika (B.H.), Caroline, Adolfo, Maria Alice, Míriam, Pedro, Giorgia, Morgana, Laura, Nilo, Rodrigo, Renner, Breno, Fábio, João Bosco e Fabrício.

BIOGRAFIA

ALESSANDRA FERREIRA DA SILVA, filha de Ester Ferreira da Silva e Cícero Vieira da Silva, nasceu no dia 27 de novembro de 1978, na cidade de Brasília-DF.

No período de março de 1997 a agosto de 1998, foi servidora da Gerência de Controle de Zoonoses do Distrito Federal

Em agosto de 2003, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária da União Pioneira de Integração Social-UPIS, em Brasília-DF.

Em agosto de 2003, iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, junto ao Departamento de Veterinária-DVT, da Universidade Federal de Viçosa-Viçosa-MG.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS.....	Página vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Criopreservação de sêmen caprino.....	4
2.2 Presença de plasma seminal	6
2.3 Diluentes.....	8
2.3.1 Diluentes à base de gema de ovo.....	10
2.3.2 Diluentes à base de leite.....	11
2.4 Crioprotetores.....	12
2.4.1 Glicerol.....	14
2.4.2 Amidas.....	15
2.5 Resfriamento, taxa de resfriamento e período de equilíbrio.....	16
2.6 Congelamento e descongelamento de sêmen.....	18
2.7 Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do sêmen criopreservado.....	19
2.7.1 Avaliação da morfologia espermática.....	20
2.7.2 Teste de termo-resistência.....	21
2.7.3 Avaliação da integridade da membrana plasmática (Teste hiposmótico).....	22
2.7.4 Avaliação da integridade de acrossômica.....	22
2.7.5 Avaliação de reação acrossômica.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Local e animais experimentais.....	25

3.2 Coleta e avaliação física do sêmen	25
3.3 Teste hiposmótico (HO).....	26
3.4 Morfologia espermática.....	26
3.5 Centrifugação.....	27
3.6 Diluição e envase.....	27
3.7 Resfriamento.....	28
3.8 Congelamento.....	28
3.9 Descongelamento e teste de termo-resistência lento.....	29
3.10 Avaliação de integridade acrossômica.....	29
3.11 Reação acrossômica.....	29
3.12 Análises estatísticas.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Características seminais no pré-congelamento.....	31
4.2 Características seminais no pós-descongelamento.....	31
4.3 Integridade funcional da membrana plasmática.....	36
4.4 Integridade acrossômica.....	38
4.5 Reação acrossômica.....	40
5. CONCLUSÕES.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE TABELAS

	Página
1- Média (M) e desvio padrão (DP) das características físicas do sêmen “ <i>in natura</i> ” de bodes da raça Alpina e Saanen.....	31
2- Percentagem média de defeitos totais maiores e menores do sêmen de bodes da raça Alpina e Saanen.....	31
3- Média e desvio padrão de motilidade espermática progressiva, durante o teste de termo-resistência lento, de sêmen congelado com três diluentes, em caprinos da raça Alpina e Saanen.....	33
4- Média e desvio padrão do vigor espermático pós-descongelamento, submetidas ao teste de termo-resistência lento, de sêmen de bodes da raça Alpina e Saanen, criopreservados em três diluentes.....	34
5- Média e desvio padrão de espermatozóides íntegros em sêmen “ <i>in natura</i> ” e pós-descongelamento, observados no teste hiposmótico (HO) e diferentes diluentes de criopreservação em bodes da raça Alpina e Saanen.....	38
6- Média e desvio padrão das lesões acrossômicas no início e final do teste de termo-resistência lento, em sêmen de bodes da raça Alpina e Saanen, criopreservadas com diferentes diluentes.....	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
1- Vigor espermático de sêmen descongelado de bodes da raça Alpina e Saanen, congelados em três diferentes diluentes e submetidos ao teste de termo-resistência lento.....	35
2- Motilidade espermática progressiva de sêmen descongelado de bodes das raça Alpina e Saanen, congelados com três diferentes diluentes e submetidos ao teste de termo-resistência lento.....	36
3- Percentagem de reações acrossômicas em sêmen descongelado de bode da raça Alpina e Saanen, congelados em três diferentes diluentes.....	41

RESUMO

SILVA, Alessandra Ferreira da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2004. **Uso da dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Conselheiros: José Domingos Guimarães e Marcelo Teixeira Rodrigues.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da dimetil-formamida e sua associação na criopreservação de sêmen caprino, por meio de análises físicas do sêmen e testes complementares, realizados durante o processo de criopreservação. Foram utilizados reprodutores das raças Alpina e Saanen pertencentes ao Setor de Caprinocultura-DZO-UFV. As partidas de sêmen foram congeladas com o diluente leite desnatado-gema, associado a diferentes crioprotetores e concentrações: 7% de glicerol (T1); 3,5% de glicerol e 3,5% de dimetil-formamida (T2) e 5% de dimetil-formamida (T3). O sêmen foi centrifugado, diluído e envasado em palhetas de 0,5 mL. Estas palhetas foram resfriadas a 5,0°C, permanecendo nesta temperatura por mais 1:20h. Em seguida, foram submetidas ao vapor de nitrogênio líquido durante 15 minutos e imersas no N₂ líquido. O descongelamento foi realizado em banho-maria, a 37°C por 50 segundos. Os parâmetros avaliados “*in vitro*” consistiram de motilidade progressiva e vigor espermático, integridade acrossômica, integridade da membrana plasmática (HO) e reação acrossômica. Foi observada uma perda de 30,0% da motilidade inicial, quando as amostras foram submetidas aos procedimentos de criopreservação. A perda de integridade da membrana plasmática, avaliada pelo teste hiposmótico (HO) foi de 19%. As lesões de acrossoma aumentaram em 3% durante o TTR lento ($P < 0,05$). Não foi observada diferença nos aspectos de motilidade, entre os espermatozóides dos tratamentos, nos aspectos de motilidade, nos tempos de 0:00h, 0:05h, e 1:00h do TTR e vigor em todos os tempos ($P > 0,05$). No tempo de 2:00h do

TTR foi observada diferença entre os tratamentos (1) e (2) ($P < 0,05$), sendo a motilidade do sêmen do T2 superior às demais. Os valores de integridade de membrana plasmática, integridade acrossômica e reação acrossômica pós-descongelamento não diferiram entre os sêmen dos tratamentos ($P > 0,05$). Estes resultados demonstram que a dimetil-formamida pode ser uma alternativa para a criopreservação de sêmen caprino, quando utilizada de forma isolada ou associada ao glicerol.

Palavras-Chave: glicerol, dimetil-formamida, sêmen caprino.

ABSTRACT

SILVA, Alessandra Ferreira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, november, 2004. **The dimethyl formamide, associated or not with glycerol, use on goat semen cryopreservation.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Committee Members: José Domingos and Guimarães and Marcelo Teixeira Rodrigues.

The objective of this study was to evaluate the dimethyl formamide and its association effects on the goat semen cryopreservation, through the semen physical analyses and complementary tests, carried out during the cryopreservation process. Alpine and Saanen bucks from the Federal University of Viçosa Dairy Goat Experimental Section- DZO were used. The semen samplings were frozen with the yolk-skimmed milk diluent, associated with different cryoprotectors and concentration: glycerol 7%; (T1); glycerol 3.5% with dimethyl formamide 3.5% (T2) 5% dimethyl formamide 5% (T3). The semen were centrifuged, diluted and bottled in a 0.5 mL straws. These straws were cooled at 5.0°C for more than 1:20h. Then they were submitted to liquid nitrogen vapor for 15 minutes and immersed in N₂ liquid. The thawing was made in water bath at 37°C for 50 seconds. The parameters evaluated “*in vitro*” were progressive motility and sperm vigour, acrossome integrity, plasmatic membrane integrity (HOST) and acrossome reaction. A 30.0% initial motility loss was observed when the samples were submitted to the cryopreservation procedures. There was a 19% plasmatic membrane integrity loss, evaluated through the hipoosmotic swelling test (HOST). The acrossome lesions increased 3% during slow TTR ($P<0.05$). No differences were observed in the motility aspects among the sperm from the treatments, motility aspects at 0.00h; 0.05h; 1.00h of TTR and vigor in all the times given ($P<0.05$). At 2.00h of TTR a difference between the treatments (1) and (2) was observed ($P<0.05$), with the T2 semen motility superior to the others ($P<0.05$). The plasmatic membrane integrity values, acrossome integrity and

acrossome reaction after the thawing did not differ between the semen from both treatments ($P>0.05$). These results show that the dimethyl formamide can be an alternative in the goat semen cryopreservation, when used alone or associated with glycerol.

key-word: glycerol, dimethyl formamide, goat semen.

1.INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos caprinos do mundo, estando grande parte deste no Nordeste, sendo a Bahia, o principal núcleo criador desta espécie (ANUALPEC, 2004).

Apesar do Brasil ser um dos maiores produtores de caprinos do mundo é também um dos maiores importadores de subprodutos dessa espécie. A importação da carne caprina, que passou de US\$ 833 em 1996 para US\$ 17,1 mil em 2000, representa um aumento significativo. Da mesma forma, o Brasil é um grande importador de peles dessa espécie, ao mesmo tempo que exporta esse produto. A exportação de pele caprina acumulada no período de 1992 a 1999 foi de US\$ 25,9 milhões, tendo sido a importação nesse mesmo período de US\$ 60,5 milhões. Em 2002, a exportação de pele caprina representou US\$ 0,3 milhões, ao mesmo tempo que a importação representou US\$ 8,9 milhões (VASCONCELOS & VIEIRA, 2002).

Os valores elevados da importação de subprodutos caprinos, por um país que é um dos maiores produtores podem ser atribuídos a vários fatores, como a desorganização da cadeia produtiva, as limitações na qualidade e na quantidade dos produtos e a disposição das unidades de processamento (LEITE, 2002).

Além da necessidade de promover melhorias nos manejos sanitários e alimentar, a utilização de técnicas e processos disponíveis, como a introdução de raças melhoradas, de cruzamentos dirigidos, pode conduzir a uma melhoria na qualidade genética dos rebanhos favorecendo o aproveitamento de todo o potencial produtivo do animal, obtendo-se matéria-prima ao longo do ano com os níveis produtivos capazes de atender as sinalizações da agroindústria e do consumidor final (LEITE, 2002).

A baixa oferta de reprodutores caprinos no sistema produtivo (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1995) faz da inseminação artificial um instrumento importante para uma difusão mais eficiente do germoplasma de animais considerados melhorados e que possam proporcionar o melhoramento genético do rebanho caprino, que no Brasil, em sua grande maioria, é caracterizado pela utilização de raças não especializadas (VASCONCELOS e VIEIRA, 2002).

A inseminação artificial (IA) tem um importante papel na criação de caprinos, especialmente em sistemas intensivos de produção, facilitando o controle reprodutivo, e no auxílio à realização de testes de progênie mais precisos e em menor espaço de tempo (LEBOEUF et al., 2000). Outras vantagens da IA incluem a sua utilização em um esquema de seleção genética mais eficiente. Comparada com a reprodução natural, a IA tem a vantagem de propiciar maior número de descendentes por macho, permitindo uma dissociação de espaço e tempo entre a coleta do sêmen e a fertilização. Essas vantagens têm conseqüências positiva nos programas de melhoramento genético por possibilitarem a avaliação e seleção de reprodutores, além de possibilitar a comparação do valor genético desses animais em diferentes rebanhos (LEBOEUF et al., 2000).

Apesar da primeira inseminação artificial em caprinos ter sido relatada por BENEDIKTOV, em 1934 (AZAWI et al., 1993), ainda há limitações, devido principalmente às dificuldades no processo de congelamento e descongelamento do sêmen (DUNNER, 1993; MÉNDEZ et al., 1994). Uma das explicações seria a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbouretrais incorporadas ao plasma, as quais podem se associar a componentes dos diluentes e produzir compostos tóxicos (SIMPLÍCIO e MACHADO, 1989). Segundo IRITANI e NISHIKAMA (1961) trata-se de uma fosfolipase A, classificada como fosfolipase A1 e A2 (ATREJA e ANAND, 1985). A ação hidrolítica dessas enzimas nos fosfolipídios de membrana e em componentes diluidores, como os fosfolipídios da gema de ovo, leva à formação de ácidos graxos e lisolecitinas, os quais são lesivos às células espermáticas (SIMPLÍCIO e MACHADO, 1989), sendo preconizada a lavagem do sêmen caprino com remoção do plasma seminal, como uma das etapas no processo de congelamento (SIMPLÍCIO e MACHADO, 1989).

Além dos fatores inerentes ao ejaculado caprino afetando a criopreservação de seus gametas, o processo de criopreservação de sêmen, particularmente no estado congelado, causa danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozóides, resultando na redução da motilidade, viabilidade e posterior transporte no trato genital feminino (LEBOEUF et al., 2000).

Os resultados contraditórios obtidos com o congelamento do sêmen dessa espécie indicam a necessidade de aprimoramento das técnicas utilizadas (STANGNARO, 1975), levando os estudiosos a rever fatores de variação, como tipo de diluente e crioprotetores utilizados (DAS e RAJKONWAR, 1995), a velocidade de resfriamento do ejaculado, a proporção e o modo de incorporação do crioprotetor na amostra (STANGNARO, 1975) e a necessidade ou não de lavagem do sêmen, entre outros (MEMON et al., 1985).

Os crioprotetores são fundamentais para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de criopreservação. Entretanto, estes podem exercer efeitos tóxicos e diminuir as taxas de fertilidade, quando presentes em altas concentrações (PAPA et al., 2003). A utilização de diversos crioprotetores e suas respectivas combinações podem minimizar e controlar os processos deletérios que ocorrem na célula espermática durante o congelamento e descongelamento, possibilitando resultados satisfatórios de motilidade e viabilidade pós-descongelamento e, conseqüentemente, melhores taxas de prenhez (PAPA et al., 2003).

O glicerol tem sido o crioprotetor mais usado para o congelamento de sêmen caprino, com resultados satisfatórios nas concentrações entre 4% e 7% do diluidor utilizado (LEBOEUF et al., 2000). Entretanto, as amidas também têm demonstrado bons potenciais como agentes crioprotetores, seja quando utilizadas isoladas ou associadas ao glicerol para o congelamento de sêmen eqüino, o que pode estar correlacionado com a sua menor toxicidade em relação ao glicerol (AMANN e PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996; MEDEIROS et al., 2002).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Criopreservação de Sêmen Caprino

Os principais danos que os espermatozóides sofrem durante a criopreservação são causados pelo congelamento. Assim, cristais de gelo intracelular e extracelular podem se formar, promovendo desidratação intracelular, alterações na membrana celular e trânsito de moléculas através da célula durante o descongelamento (AMANN & PICKETT, 1987).

BOGART e MAYER (1950) enfatizaram que os espermatozóides estão sujeitos a muitos tipos de condições adversas, desde a coleta de sêmen até a inseminação artificial. O rápido resfriamento do sêmen, objetivando a manutenção da viabilidade espermática por um longo período (PICKETT, 1993), submete os espermatozóides ao choque térmico, termo que define um conjunto de alterações parcialmente irreversíveis da célula espermática, que ocorrem quando o sêmen não é manipulado de forma correta. Tais alterações reduzem a viabilidade dos espermatozóides e ocorrem quando este sofre uma redução da temperatura de 20°C para 1°C (AMANN & PICKETT, 1987).

Durante a criopreservação, membranas que compõem as células espermáticas, componentes do citoesqueleto e da cromatina são suscetíveis às injúrias. Entre as membranas espermáticas que podem ser afetadas, incluem-se a membrana plasmática, a membrana acrossomal externa e a membrana mitocondrial (WATSON, 1995). Essas injúrias podem ser irreversíveis, pois a organização lipídica das membranas é alterada após este procedimento (HISKOVSKA-GALCHEVA et al., 1989; BUHR et al., 1994).

Duas condições estressantes à célula espermática ocorrem durante a criopreservação: a primeira condição está relacionada com os efeitos da mudança de temperatura e a segunda, à formação dos cristais de gelo (WATSON, 1995).

Segundo WATSON (1995), a severidade das alterações é ainda maior entre 12 e 2°C e as conseqüências podem ser observadas, sobretudo, na membrana plasmática, no acrossoma e nas mitocôndrias (PURSEL et al., 1973; WATSON & PLUMMER, 1985). Contudo, HARRISON e VICKERS (1990) por meio de experimentos, observaram que a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides de mamíferos foi rapidamente perdida durante o choque térmico, enquanto a maioria das mitocôndrias permaneceram intactas.

As dificuldades inerentes ao processo de criopreservação não estão na habilidade dos espermatozóides se manterem viáveis a -196°C (temperatura em que não há reações bioquímicas, nem energia térmica dentro das células), mas sim, em suportar os danos que ocorrem durante o congelamento e o descongelamento, principalmente ao passarem pela zona de temperatura crítica, entre -15°C e -60°C. Nesta faixa de temperatura, ocorrem fenômenos oriundos do processo de resfriamento, tais como: formação de cristais intracelulares e extracelulares, desidratação e distorção da membrana plasmática (ANGOLA, 1994).

Outro aspecto referente a crioinjúria está associado aos danos celulares que também podem ocorrer durante o descongelamento, devido à recrystalização de cristais de gelo microscópicos, que formarão os grandes cristais lesivos à estrutura espermática (WATSON, 1995).

Diferentes graus de resistência da célula espermática ao processo de criopreservação são observados entre as espécies. Exames da ultra-estrutura espermática com microscopia eletrônica, antes e após o congelamento, mostraram que a ultra-estrutura de espermatozóides bovinos eram quase idênticos antes e depois do processo. Contudo, espermatozóides de ovinos e suínos apresentaram danos consistentes na membrana externa e no complexo acrossomal, com formação de edema de acrossoma e remoção total de regiões citoplasmáticas. Já em equinos, as lesões encontradas foram mínimas (HEALEY, 1969).

Os índices de congelabilidade do sêmen caprino são influenciados por diversos fatores, destacando-se: variações individuais (CORTEEL, 1985; MACHADO, 1991); raciais (CORTEEL, 1985); condição clínica-andrológica dos doadores (SIMPLÍCIO e MACHADO, 1989); variações sazonais (CORTEEL, 1985) e o método de coleta (IRITANI e NISHIKAWA, 1964), dentre outros. Desse modo, com o objetivo de minimizar esses fenômenos, são adicionadas aos diluentes de sêmen, substâncias crioprotetoras, como o glicerol e as amidas (ANGOLA, 1994).

2.2. Presença de Plasma Seminal

A função do plasma seminal vem sendo discutida de forma controversa, como descrito em vários artigos. Acreditava-se que o plasma seminal tinha pouquíssima importância na reprodução, baseado nas observações de que o espermatozóide suíno do epidídimo poderia ser inseminado com sucesso. Durante as últimas décadas, tem se tornado evidente que a fertilização não é um simples processo, mas sim, o resultado de um grande número de processos precisamente controlados. Hoje não há dúvida de que o plasma seminal tem um importante papel nas funções reguladoras do processo anterior ao da penetração do espermatozóide no ovócito. Algumas dessas funções estão baseadas na interação direta entre plasma seminal e espermatozóide: nutrição, proteção, regulação da motilidade, capacitação, reconhecimento e ligação gamética. Outros efeitos estão relacionados com o trato genital feminino e por isso, podem influenciar indiretamente a fisiologia do espermatozóide, via intensificação das contrações uterinas, do relaxamento do istmo tubário e da modulação imunológica do útero (WABERSKI, 1996).

No bode, a remoção do plasma seminal, imediatamente após a coleta, aumenta a porcentagem de células vivas e a motilidade durante a preservação em diluentes à base de gema de ovo ou leite, mas com qualidade inferior à encontrada no epidídimo, indicando a presença no plasma seminal como um componente prejudicial para a criopreservação (LEBOEUF et al., 2000).

AAMDAL et al. (1965) verificaram a presença de uma enzima no plasma seminal, conhecida como “fator coagulante da gema de ovo” ou lecitinase ou fosfolipase A, que causava a imobilidade dos espermatozóides. Essas enzimas

catalisavam a hidrólise da lecitina da gema de ovo em ácidos graxos e lisolecitinas, sendo as últimas as responsáveis pela toxicidade aos espermatozóides (AZAWI et al., 1993; MÉNDEZ et al., 1994). Assim, a presença de fosfolipases no plasma seminal de caprinos, comprometendo a viabilidade do sêmen durante o processo de congelamento, leva a muitos questionamentos sobre o método a ser adotado para a criopreservação espermática nesta espécie, influenciando a técnica de remoção do plasma seminal (BARBOSA, 1999).

A diminuição da sobrevivência dos espermatozóides durante o congelamento em diluentes com leite é proveniente de uma fração protéica, originária da glândula bulbouretral caprina, denominada SBUIII, que interage com os constituintes do diluente, inibindo a motilidade do espermatozóide, deteriorando a qualidade dos movimentos, promovendo lesões no acrossoma e morte dos espermatozóides. O componente glandular responsável por esse efeito tem sido identificado como uma lipase triacilglicerol (PELLICER, 1995).

Apesar da existência de trabalhos relativos à bioquímica do sêmen, há limitada informação sobre a congelabilidade de sêmen caprino e os efeitos da técnica de remoção do plasma seminal nos danos de membrana plasmática e na liberação das enzimas Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT) e Glutamato Piruvato Transaminase (GPT). Essas liberações no líquido extracelular têm sido usadas como indicativo de danos na membrana das células espermáticas, existindo correlação negativa entre a liberação de GOT e GPT e a motilidade progressiva, durante o pré e pós-congelamento do sêmen (TULI et al., 1991).

TULI e HOLTZ (1992) reportaram diferença significativa na liberação da enzima GOT no líquido extracelular, quando utilizaram diferentes diluentes no processo de congelamento de sêmen caprino. De forma semelhante, SINGH et al. (1993) demonstraram ter havido maior liberação de GOT e GPT pós-diluição, pré e pós-descongelamento, com o uso de diluente à base de lactose do que com o diluidor Tris, demonstrando assim, superioridade desse, na manutenção da integridade dos espermatozóides.

Com relação à liberação de GOT e à quantidade de glicerol usado no congelamento de sêmen, foram observados maiores extravasamentos da enzima com

a ausência de glicerol, do que quando se utilizou glicerol na proporção de 10% do meio (DROBNIS et al., 1980).

MEMON et al. (1985) e DUNNER (1993) observaram perda da motilidade espermática progressiva e da morfologia acrossomal na presença do plasma seminal com diluidor leite, sem presença de gema, concluindo ser benéfica a remoção do plasma seminal na preservação da integridade dos espermatozóides após o descongelamento, independente do diluente usado. Adicionalmente, não relataram aumento na porcentagem de danos acrossomais em sêmen lavado.

Ejaculados caprinos lavados duas vezes em solução de Krebs-ringer-fosfato-glicose, sob centrifugação de 700g e, finalmente, diluídos em leite desnatado contendo 0,05% de glicose e 7% de glicerol (adicionado em duas etapas após o período de equilíbrio), apresentaram apenas 1,3% de diminuição na taxa de SPTZ móveis, enquanto nos ejaculados não lavados e diluídos no mesmo meio, a redução da motilidade foi de 22% aos 180 dias de conservação a -196°C. Assim, a lavagem do ejaculado caprino melhora a sua capacidade de conservação, quando diluído em solução à base de leite desnatado e estocado a -196°C, em nitrogênio líquido (CORTELL e BARIL, 1975), uma vez que existe correlação negativa entre o volume do plasma no ejaculado e a porcentagem de células móveis após o descongelamento (CORTEEL e LEBOEUF, 1988).

Por outro lado, PINTADO et al. (1992) ao utilizarem diluente à base de Tris-glicose-gema e dupla centrifugação a 700g com o próprio diluente como solução de lavagem, concluíram que os procedimentos de congelamento e centrifugação reduzem significativamente, a viabilidade espermática “*in vitro*”. Da mesma forma, RESENDE e WEITZE (1987) obtiveram taxa de fertilidade de 52% em inseminações intra-uterina, empregando como diluente, uma solução de Tris e gema de ovo sem retirada do plasma seminal no sêmen congelado.

2.3. Diluentes

O sêmen caprino é muito sensível ao choque térmico, às variações de pH e pressão osmótica da solução diluente (DEKA e RAO, 1985a). Sendo assim, o uso do diluente apropriado é básico para o sucesso da preservação dos espermatozóides

(AZAWI et al., 1993). Um diluente ideal precisa ter alguns requisitos: nutrientes como fonte energética para os espermatozóides; crioprotetores que minimizem os efeitos do resfriamento e congelamento; manutenção do balanço eletrolítico e pressão osmótica; além da presença de antibióticos, os quais inibem o crescimento microbiano (MEMON e OTT, 1981).

Segundo SILVA FILHO (1994), citado por PEREIRA (2000) os componentes básicos dos diluidores são: água, tampões ou substâncias iônicas, macromoléculas, carboidratos e antibióticos. As macromoléculas ou lipoproteínas, tais como as contidas no leite ou gema de ovo protegem o espermatozóide do choque térmico. Os carboidratos ou substratos metabolizáveis, tais como glicose, atuam como fonte de energia. Os tampões ou substâncias iônicas, tais como soluções a 11% de lactose removem os íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo espermático e os antibióticos, como penicilina e estreptomicina retardam ou eliminam o crescimento bacteriano (ENGLAND, 1993; NELSON & COUTO, 1994). Alguns dos diluentes mais usados no congelamento de sêmen caprino são à base de citrato de sódio, gema de ovo, lactose, água de coco, Tris e leite de vaca desnatado em pó e reconstituído (BARBOSA,1999).

Para transformar uma célula mais resistente ao choque térmico, seria necessária uma redução no número de canais ou poros que se formam na membrana plasmática durante a redução da temperatura. Com isso, perdas inerentes ao choque térmico seriam reduzidas. Presumivelmente, estas seriam ações das macromoléculas contidas nos diluidores de leite ou gema de ovo (PICKETT, 1987)

A instabilidade dos constituintes dos diluentes, depois de dissolvidos (BERLINER, 1942) e a diferença existente na composição da membrana espermática entre espécies, raças e, ainda entre indivíduos da mesma espécie devem ser considerados como obstáculos para a seleção dos diluidores (HOLT, 2000). A determinação de um diluidor mais eficaz na criopreservação dos espermatozóides contribuirá para diminuir os fatores da variabilidade individual em tolerar os efeitos deletérios da criopreservação (SANTOS, 2003).

DESHPANDE E MEHTA (1991), comparando motilidade espermática pós-descongelamento, para avaliar diluentes citrato-gema, tris-gema e leite desnatado,

observaram melhores resultados com o citrato-gema, seguindo-se o tris-gema e os piores resultados foram obtidos com o diluente à base de leite desnatado. Por sua vez, DEKA e RAO (1987) e MÉNDEZ et al.(1994) mencionaram melhores resultados de motilidade espermática pós-descongelamento com o diluente tris-gema comparado com o citrato.

BARBOSA (1999) concluiu que a criopreservação de sêmen total caprino com diluentes contendo leite desnatado-gema produzia taxas de gestação e prolificidade semelhantes aos procedimentos de monta natural. Entretanto, ANDRADE (1996) observou que o uso de diluente Tris-frutose-gema para congelação de sêmen caprino resulta em maior taxa de fertilidade, quando comparado com a solução diluente à base de leite desnatado UHT. Estes dados demonstram que os resultados de congelamento de sêmen caprino ainda são inconsistentes, dificultando a definição de um diluidor mais adequado.

2.3.1 Diluentes à base de gema de ovo

Freqüentemente, os diluentes utilizados na criopreservação espermática possuem na sua composição gema de ovo, que oferece proteção sobre a membrana do espermatozóide (SANTOS, 2003), não sendo, porém, igualmente efetiva para todas as espécies (WATSON, 1995).

A gema de ovo contém lecitina, seu componente fosfolipídico, que parece proteger a membrana por restituir os fosfolipídeos perdidos pelos espermatozoides, durante o choque térmico (WATSON, 1995). Segundo BOUCHARD et al. (1990), os fosfolipídios interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides, conferindo-lhes proteção durante o crioprocessamento (HOLT, 2000).

A resistência que os espermatozoides adquirem com a adição de gema de ovo deve ser dependente da presença de fator ou fatores em iniciar ou produzir alterações na célula, resultando em maior resistência às condições desfavoráveis. Existem duas formas de resistência: adquirida ou inerente. Mais de 90% dos espermatozoides do epidídimo são inerentemente resistentes, mas podem perder esta resistência ao passarem pelo trato genital masculino até serem ejaculados. Neste ponto, apenas uma

pequena proporção retém a capacidade de resistir às variações do meio (MAYER & LASLEY, 1945). Os autores acrescentaram que indivíduos dentro da mesma espécie e diferentes espécies de animais variam quanto ao número de células no sêmen, que apresentam esta capacidade inerente de resistência.

A gema de ovo é empregada junto aos diluidores em concentrações que variam de 10 a 20% (ENGLAND, 1993). Contudo, o teor a ser adicionado relaciona-se também à capacidade tampão de outros componentes do diluidor (FARSTAD, 1996).

Resultados inferiores de MIP (motilidade individual progressiva) pós-descongelamento foram obtidos por DUNNER (1993), quando o glicerol foi adicionado antes da refrigeração e na ausência de gema de ovo. O autor atribuiu o ocorrido à brusca mudança de osmolaridade provocada pela adição do glicerol em temperaturas mais elevadas, podendo elevar a osmolaridade do meio para níveis acima de 600mOsmol/L, o que não é suportado pela célula espermática caprina. Essa alteração não foi verificada quando o meio diluente continha gema de ovo.

2.3.2 Diluentes a base de leite

Assim, como a gema de ovo, o leite desnatado tem efeito crioprotetor por ação da caseína, sendo o diluente mais usado para a espécie caprina (BARBOSA, 1999).

O diluidor de Mínima Contaminação, proposto por KENNEY et al. (1975), constituído por uma associação de leite em pó desnatado e glicose, tem sido utilizado por vários pesquisadores. Essa superioridade do leite também foi relatada por MELO e NUNES (1991), quando o compararam em relação à água de coco, com base na motilidade progressiva pós-descongelamento, sendo que estes resultados podem ser atribuídos à diferença na composição dos diluentes usados, como também, ao método de processamento e congelamento do sêmen caprino (TULI e HOLTZ, 1994; DAS e RAJKONWAR, 1995).

VARNER et al. (1988) trabalhando com diferentes curvas de resfriamento e utilizando o diluidor de leite e glicose, obtiveram adequada proteção ao espermatozóide equino contra o choque térmico, quando se avaliou o parâmetro de conservação da motilidade espermática. Segundo os autores, os fosfolipídios

presentes no leite podem agir promovendo modificações estruturais na membrana plasmática do espermatozóide, permitindo com isso, sua adaptação a baixas temperaturas. Outro mecanismo de ação pode estar correlacionado com a ligação de várias substâncias presentes no leite, tais como lecitina e caseína, ao cálcio liberado na camada lipoprotéica externa do espermatozóide, quando ocorre o choque térmico, impedindo que este passe para o interior da célula e desorganize o citoplasma e iniba sistemas enzimáticos (QUINN e WHITE, 1966).

Diferentes tipos de diluentes à base de leite e seus derivados têm sido propostos pelos pesquisadores, destacando-se dentre eles, a associação do leite desnatado aquecido com a gema de ovo (TISCHNER, 1988). MIHAILOV (1949), ao comparar o tempo de sobrevivência espermática equina com a utilização de leite de diferentes espécies, observou que o leite de vaca permitia uma sobrevivência de até 108 horas. Da mesma forma, THACKER et al. (1994) demonstraram a capacidade do leite em manter a motilidade do sêmen bovino por um período satisfatório.

Devido à complexidade da composição do leite, existem componentes que podem ser benéficos ou prejudiciais aos espermatozoides (BATELLIER et al., 1997). Desta forma, THACKER et al. (1994) verificaram que resultados benéficos foram obtidos com o aquecimento do leite, devido à hidrólise da lactose em glicose e galactose, que são fontes de energia prontamente disponíveis para os espermatozoides.

THACKER et al. (1994) observaram a presença desses fatores presentes no leite não aquecidos, que se apresentavam tóxicos para os espermatozoides bovinos. Possivelmente, a lactenina, um agente antiestreptocócico encontrado no leite cru, seria o fator tóxico (FLIPSE et al., 1954). Vários pesquisadores concluíram que o leite fresco, desnatado ou integral, deveria ser aquecido ou tratado quimicamente com substâncias contendo radicais sulfidrilas, para promover maior viabilidade dos espermatozoides (BOYDE et al., 1954).

2.4. Crioprotetores

A utilização de agentes crioprotetores no congelamento do sêmen é essencial para a manutenção da qualidade espermática. Entretanto, não permitem a

sobrevivência de 100% das células, o que pode ser explicado por apresentarem efeitos tóxicos, que dependem principalmente da concentração do crioprotetor utilizado e do período de exposição da célula ao mesmo (SANTOS, 2003).

Lesões na membrana espermática, efeitos osmóticos indesejáveis, alterações das interações entre os espermatozoides e o trato reprodutivo das fêmeas e disfunção da fusão do espermatozoide com o ovócito podem ser efeitos da toxicidade dos crioprotetores utilizados (HAMMERTEDT e GRAHAM, 1992).

Os crioprotetores devem proteger as células da formação e desestruturação dos cristais de gelo, das mudanças de meio e do estresse resultante da mudança na temperatura (WATSON, 1995).

Estes crioprotetores podem ser classificados segundo seu mecanismo de ação. O glicerol, juntamente com outras pequenas moléculas como o metanol, etilenoglicol, 1,2-propanodiol, butanodiol, dimetilsulfóxido e as amidas pertencem ao grupo que penetra na célula. As grandes moléculas presentes no leite, gema de ovo, açúcares e nos polímeros sintéticos são classificados como crioprotetores não-permeantes (HOLT, 2000).

Os crioprotetores permeantes atuam por meio de suas propriedades coligativas, diminuindo o ponto crioscópico intracelular. Desta forma, uma quantidade maior de água vai permanecer no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos, proporcionando um ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento (WATSON, 1995).

Os crioprotetores não permeantes protegem a célula por meio de efeitos osmóticos. Estas substâncias criam um meio hipertônico que induz a saída de água do meio intracelular para o extracelular, causando a desidratação do espermatozoide e posterior redução da formação de cristais intracelulares durante a congelamento (DALIMATA e GRAHAM, 1997). Além disso, tanto os crioprotetores permeantes quanto os não-permeantes interagem com os fosfolipídios presentes na membrana espermática e permanecem associados a estes durante todo o processo de congelamento, conferindo estabilidade à membrana (DALIMATA e GRAHAM, 1997).

DALIMATA e GRAHAM (1997) observaram que o uso combinado de diversos crioprotetores pode oferecer maior proteção que seu uso isolado. Além disso, alguns podem favorecer a ação de outros.

A escolha do crioprotetor parece ser uma prova de tentativa e erro em quase todas as investigações. Isto é parcialmente devido ao fato de ainda não haver uma explicação completa e satisfatória do mecanismo de ação dos crioprotetores (HOLT, 2000). Sendo assim, novas pesquisas são necessárias na busca de crioprotetores ou na combinação destes, com o intuito de diminuir o efeito tóxico e melhorar os índices de fertilidade do rebanho caprino selecionado.

2.4.1 Glicerol

O glicerol é um álcool polihídrico altamente permeável e amplamente empregado no congelamento de sêmen nas diferentes espécies (RODRIGUES, 1997). Sua descoberta foi um dos maiores avanços na criopreservação espermática, evitando alterações irreversíveis, como a redução da estabilidade da membrana plasmática associada ao aumento da permeabilidade, danos no acrossoma, desidratação celular, liberação de enzimas e fosfolipídios (CAVALCANTI et al., 2002).

O efeito protetor do glicerol é mediado por propriedades coligativas, depressão do ponto de congelamento e uma conseqüente redução da concentração de eletrólitos na fração não congelada em qualquer temperatura (LOVELOCK e POLGE, 1954). Associado a este primeiro mecanismo de ação, segundo HAMMERSTEDT e GRAHAM (1992), o glicerol pode promover alterações na bicamada lipídica, ao penetrar entre os fosfolipídios e promover a estabilidade da membrana plasmática, interagir com o citoesqueleto e proteínas microtubulares espermáticas, além de participar do metabolismo celular.

Apesar do efeito protetor, o glicerol é tóxico e sua concentração no meio diluidor deve estar entre a mínima necessária para promover proteção e a máxima permitida para não causar danos aos espermatozóides (COTORELLO e HENRY, 2002).

A concentração ótima de glicerol pode ser influenciada por outros componentes do diluente, além da curva de resfriamento e protocolo de congelamento

e descongelamento. Contudo, o fator determinante está relacionado com a espécie (SANTOS, 2003).

FRASER (1962) verificou que os melhores resultados no congelamento de sêmen caprino foram obtidos, utilizando 6 a 9% de glicerol, uma e meia a duas horas de período de equilíbrio e taxa de resfriamento muito lenta de 4°C para 0°C. O sêmen assim congelado foi utilizado para inseminar seis cabras, das quais cinco ficaram gestantes na primeira inseminação.

Segundo WAIDE et al. (1977), o glicerol promove maior proteção ao sêmen caprino que o etilenoglicol e o propilenoglicol, sendo que suas concentrações devem variar de 3 a 9% nos meios diluentes (LEBOEUF et al., 2000).

2.4.2 Amidas

As amidas, tal como a formamida, a acetamida e a lactamida, são agentes crioprotetores permeantes que promovem bons resultados, quando utilizadas na preservação de espermatozóides de bovinos, eqüinos, suínos (exceto formamida) e coelhos, durante o processo de resfriamento e congelamento (HANADA e NAGASE, 1980; DALIMATA e GRAHAM, 1997; KEITH, 1998; SNOECK et al., 2001).

SANTOS (2003) observou melhores resultados nos testes “*in vitro*” de sêmen canino descongelado, quando utilizou diluentes contendo Lactose-gema e 5 % de dimetil-formamida.

VIDAMENT et al. (2002) avaliaram o efeito de concentrações crescentes de glicerol e dimetil-formamida sobre a motilidade e fertilidade do espermatozóide eqüino e observaram que a dimetil-formamida a 2% foi tão eficiente quanto o glicerol (2 a 3 %) em manter a motilidade e capacidade de fertilização dos espermatozóides eqüinos. Porém, MEDEIROS et al. (2002), estudando o efeito de três amidas (dimetil-formamida, metil-formamida e dimetil-acetamida) sobre o sêmen eqüino congelado, observaram que as amidas foram mais eficientes em proteger os espermatozóides dos efeitos deletérios do congelamento quando comparadas ao glicerol, superioridade também observada na preservação do sêmen de garanhões considerados de baixa congelabilidade (GOMES et al., 2002).

A dimetil-acetamida tem demonstrado ser um agente crioprotetor superior ao glicerol para o congelamento espermático de aves e peixes, estando associada a boas taxas de fertilidade (LAKE and RAVIE, 1984; McNIVEN et al., 1993; HUBNER e SCHRAMM, 1989). Da mesma forma, ANDREEV et al. (1984) relataram que a presença de dimetil-formamida em diluidores para sêmen e congelado de gansos, promovem taxas de gestação de 81% e 90,8%, respectivamente.

As amidas aparecem como alternativas de crioprotetores no congelamento do sêmen, uma vez que não apresentam efeitos tão tóxicos quanto o glicerol (BLANCO et al., 2000). Entretanto, os efeitos das amidas na criopreservação do sêmen caprino não foram relatados na literatura consultada.

2.5. Resfriamento, taxa de resfriamento e período de equilíbrio.

A proposta do resfriamento do sêmen é reduzir o metabolismo celular e a sua deterioração. Contudo, o resfriamento rápido pode levar ao choque térmico e a outras lesões. A taxa de resfriamento vai depender do volume do sêmen diluído e da temperatura inicial da suspensão espermática (SQUIRES et al., 1999).

No processo de resfriamento dos espermatozóides, alterações no arranjo laminar da membrana plasmática podem ser evidenciadas, quando esta possui em sua constituição fosfolipídios de cadeias altamente insaturadas. Alguns desses fosfolipídios podem assumir um arranjo circular, denominado de hexagonal-II, com as extremidades hidrofílicas internas e as extremidades hidrofóbicas externas. Para muitos lipídios, essa formação da fase hexagonal-II é transitória até o início da fase cristalina e gel. Porém, para certos fosfolipídios, essa estrutura permanece durante todo o resfriamento e torna-se irreversível, impossibilitando a reorganização do arranjo bilaminar, quando há o aquecimento do espermatozóide em temperatura ambiente. Com isso, há formação de canais hidrofílicos, que possibilitam a passagem de íons ou outras moléculas pequenas, levando assim, a um aumento prejudicial da permeabilidade da membrana (AMANN & PICKETT, 1987).

Quando uma membrana plasmática é resfriada, seus componentes podem organizar-se pela agregação de lipídios constituintes de camada simples e redistribuição de proteínas (ORTMAN e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994).

Entretanto, a composição das membranas que recobrem os espermatozóides difere entre suas regiões, razão pela qual ocorre resposta diferenciada ao efeito do resfriamento. Assim, os espermatozóides requerem um período de resfriamento adequado para desenvolverem resistência máxima aos efeitos da criopreservação (ENGLAND, 1993). É durante este período que os espermatozóides interagem com os componentes da gema de ovo e adquirem resistência ao choque térmico e à criopreservação (WATSON, 1996).

As alterações físicas e químicas das membranas celulares, causadas pelo resfriamento, podem ser irreversíveis assim como a diminuição da fluidez e aumento na permeabilidade da membrana, danos ao acrossoma, liberação de enzimas e fosfolípidios, redução na atividade metabólica e no consumo de ATP. Todas essas consequências podem comprometer parcial ou totalmente a fertilidade (WEITZE e PETZOLDT, 1992; FARSTAD, 1996).

As taxas de resfriamento podem ser divididas em três categorias: lentas ($<0,33^{\circ}\text{C}/\text{min}$); médias ($0,33^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $< 1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e rápidas ($>1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$) (DOUGLAS HAMILTON et al., 1984).

No espermatozóide eqüino, as alterações na natureza biofísica iniciam na temperatura abaixo dos 37° e, especialmente dos 20°C . Além disso, o sucesso da criopreservação provém das interações entre diluidor e células espermáticas, taxas de resfriamento e temperatura de armazenamento (AMANN e PICKETT, 1987). Assim, o sêmen pode ser rapidamente resfriado de 37°C a 20°C , mas deve ser resfriado a taxas menores ou iguais a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 20°C a 5°C para que haja a manutenção da fertilidade.

O período de equilíbrio mais indicado para a congelamento de sêmen caprino encontra-se entre 1 a 4 horas (DAS e RAJKONVAR, 1995; DUTTA et al., 1996). Quando o sêmen é congelado sem a eliminação do plasma seminal, o ejaculado fresco pode ser diluído em uma diluição simples com glicerol à temperatura de 30°C , resfriado por 1-1,5 h a $4-5^{\circ}\text{C}$ e congelado sem o período de equilíbrio (RITAR et al., 1990).

2.6 Congelamento e descongelamento de sêmen

Cada tipo celular possui uma taxa de congelamento ótima para sobreviver à criopreservação. Com relação aos espermatozóides, foram determinadas várias taxas que podem variar conforme a espécie animal em questão, o diluidor utilizado, o método de estocagem de sêmen e a concentração do crioprotetor no diluidor (WATSON, 1995).

É importante salientar que a curva de congelamento ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozóides se desidratem e, rápida o bastante para evitar que os espermatozóides fiquem expostos por muito tempo às altas concentrações de soluto (SNOECK, 2003).

Muitos danos são verificados após o processo de congelamento e descongelamento (WATSON, 1995; HOLT, 2000), tendo a etapa de congelamento influência decisiva sobre a viabilidade dos espermatozóides submetidos à criopreservação (PENÃ e LINDE-FORSBERG, 2000).

O processo de descongelamento pode ser tão deletério aos espermatozóides quanto a congelamento e, os principais efeitos adversos são atribuídos à recristalização de microcristais de gelo intracelular, quando o descongelamento é realizado lentamente, ou devido a alterações bruscas do volume celular, quando o descongelamento se procede muito rapidamente, além de alterações de estrutura e função da membrana plasmática (WATSON, 1995; HOLT, 2000).

HOLTS et al. (1992), estudando a permeabilidade das membranas espermáticas de carneiro, observaram que a maioria das lesões ocorria na faixa de 2 a 30°C do descongelamento, ou seja, depois da dissolução dos cristais de gelo e rediluição.

TULI et al. (1991), utilizando testes “*in vitro*” de sêmen de bodes Boer, encontraram melhores resultados com descongelamento de palhetas em 70°C por 7 segundos, quando comparado ao descongelamento em 37°C por 2 minutos ou a 40°C por 20 segundos.

De modo geral, o descongelamento é realizado levando-se em consideração a taxa de congelamento. Se o congelamento foi realizado de maneira rápida, assim deve ser o procedimento para o descongelamento e vice-versa (STROM et al., 1997).

2.7 Avaliações “*in vitro*” do sêmen criopreservado

A inseminação artificial com sêmen congelado consiste no método de análise “*in vivo*” mais eficiente, quando se tem o intuito de avaliar a manutenção do potencial fértil dos espermatozoides (ENGLAND, 1993). No entanto, as análises “*in vivo*” requerem uma gama de animais para serem avaliados e também dependem de uma variedade de fatores, que vão além da qualidade seminal, tais como, número de doses e volume ideal de sêmen para realização da inseminação, número de inseminações, local de deposição do sêmen, momento ideal para inseminação, além dos fatores individuais da fêmea (FARSTAD, 1996).

Com o objetivo de analisar algumas das características que os espermatozoides mantêm após a descongelamento, análises “*in vitro*” podem ser empregadas. Estas devem avaliar a função espermática, isto é, avaliando a célula como estando apta ou não a realizar a fecundação do ovócito, semelhante ao que seria avaliado em estudos “*in vivo*”. Para tal, o sêmen deve ser submetido a alguns testes específicos que analisam, entre outras características, os seus parâmetros físicos, a integridade da membrana plasmática e do acrossoma, além da longevidade dos espermatozoides (ROTA et al., 1998; LARSSON e RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 2000).

A variável mais utilizada para estimar o percentual de espermatozoides viáveis é a avaliação subjetiva da motilidade e do vigor. Embora úteis e rotineiramente empregados, esses métodos não são os ideais, pois consideram apenas duas características da célula espermática. Além disso, estão sujeitas às influências de alguns fatores, como a temperatura de conservação da amostra, o volume da gota, tempo entre preparo da lâmina e sua avaliação, assim como a variação inter-avaliadores (ZÚCCARI, 1998).

O processo de preservação do sêmen, particularmente no estado congelado, causa danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozoides, resultando na redução da motilidade, viabilidade, dificultando o transporte no trato reprodutivo feminino e, conseqüentemente, prejudicando a fertilidade (LEBOEUF et al., 2000).

Segundo CBRA(1998), as características seminais de caprinos devem seguir o seguinte padrão: volume superior a 0,8 mL; turbilhonamento presente; vigor acima de 3; n° total de espermatozóides acima de 2×10^9 ; motilidade espermática de 80%; acima de 90% de espermatozóides normais e produção de até 20 ejaculados/semana .

Entretanto, ao utilizar sêmen congelado, este deverá conter alguns requisitos pós-descongelamento, de acordo com a portaria SDR-26, de 05/09/1996, proposta pelo CBRA (1998): volume da dose maior que 0,25 ml; motilidade progressiva maior que 30%; vigor maior que 2; defeitos totais menores que 20%; defeitos totais maiores inferiores a 10% e número de espermatozóides com motilidade progressiva maior que 40×10^6 por dose.

2.7.1 Avaliação da morfologia espermática

Espermatozóides anormais podem alcançar a zona pelúcida (ZP) “ *in vitro*”, contudo, penetram de forma insatisfatória, promovendo falha da formação normal do pró-núcleo masculino. Assim, nos órgãos genitais femininos ocorrem a seleção dos espermatozóides, para que apenas as células espermáticas normais cheguem ao sítio de fertilização. (PILIP et al., 1996).

Após a criopreservação, o exame do sêmen criopreservado é realizado pela microscopia acoplada a contraste de fase, atentando para alterações de membrana, como danos de acrossoma e defeitos de cauda. Estes danos são frequentemente produtos do processamento do sêmen e não estão relacionados com a baixa fertilidade do reprodutor. Porém, indicam falha na criopreservação e compromete apenas a fertilidade da dose inseminante, se estes danos estiveram em índices elevados (DEEN DAAS, 1997).

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozóides, podem ser utilizados esfregaços corados ou preparação úmida, associados ou não. O método de preparação úmida é mais indicada que esfregaços corados por técnicas convencionais. Entretanto, colorações específicas para determinadas partes do espermatozóide podem melhorar a acuidade do exame (CBRA, 1998).

2.7.2 Teste de termo resistência

Com o propósito de prever a fertilidade seminal, uma das características avaliadas é o comportamento dos espermatozoides incubados a 37°C (BARNABE et al., 1981). Nesta condição, LUCWICK et al. (1948), citados por BARNABE et al. (1981) observaram uma relação altamente significativa entre fertilidade e longevidade de espermatozoides de bovinos a 38°C.

Os testes de termo resistência adquiriram grande aceitação, uma vez que o sêmen é submetido à condição de temperatura semelhante à que fica exposto no trato genital das fêmeas em estro, dando uma idéia de resistência do sêmen pós-inseminação (BARNABE et al., 1981). Entretanto, segundo estes mesmos autores, o teste de resistência lento é uma prova demasiadamente rígida para a avaliação de amostras de sêmen.

De acordo com o CBRA (1998), o teste é realizado mantendo a amostra em banho-maria a 37°C, sendo que após cinco minutos, a motilidade espermática não poderá ser inferior a 30% com vigor mínimo de 2, para o sêmen congelado.

MCLAUGHLIN et al. (1992) verificaram que o processo de criopreservação diminui a motilidade média dos espermatozoides em cerca de 40% dos valores iniciais, com redução maior no sêmen de pior qualidade. A perda da motilidade espermática progressiva pode ter ocorrido tanto em função de danos na membrana, quanto da redução da motilidade que varia entre os ejaculados.

SANTOS (2001) e BARBOSA (1999) observaram que tanto a motilidade espermática quanto o vigor apresentam comportamento semelhante durante o TTR: elevadas nas primeiras horas do teste, diminuindo nas horas intermediárias e, posteriormente, estabilizando-se em valores baixos nas horas finais do teste.

NUNES (1988), utilizando o TTR lento e avaliando a qualidade seminal caprina após a criopreservação com dois diluidores (água de coco e leite desnatado), verificou que o diluente leite desnatado apresentou motilidade pós-descongelamento superior (75%). Entretanto, as partidas diluídas em água de coco apresentaram maior manutenção da motilidade espermática.

2.7.3 Avaliação da integridade da membrana plasmática (Teste Hiposmótico)

A integridade da membrana dos espermatozóides não é importante apenas para o metabolismo espermático, mas também para o sucesso do processo de fertilização. A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática pode ser usada como indicador da capacidade fertilizante dos espermatozóides (JEYEDRAN et al., 1984).

O uso do teste hiposmótico (HO) tem sido descrito em diversas espécies, principalmente em humanos. Sendo que este baseia-se no comportamento dos espermatozóides, quando submetidos a um meio hiposmótico. Para equilibrar os meios intra e extracelular, ocorre influxo de água através da membrana, provocando edema, principalmente na região da cauda, que resulta no enrolamento da mesma, sendo esta alteração facilmente visualizada em microscópio de contraste de fase, correspondendo a uma característica de integridade estrutural e funcional da membrana (JEYEDRAN et al., 1984).

FONSECA et al. (2001) estabeleceram que soluções hiposmóticas com 100 e 150mOsmol/Kg promovem maiores percentuais de dobramento de cauda para sêmen caprino congelado, quando comparadas com soluções de 50, 75, 125, 200, 290 e 300 mOsmol/Kg.

2.7.4 Avaliação da Integridade Acrossômica

O acrossoma mamífero é uma bolsa ou capuz cefálico contendo no seu interior enzimas (lisossomas) essenciais para a fecundação do ovócito, derivado do complexo de Golgi e se localiza na porção anterior do núcleo espermático (CROSS & MEIZEL, 1989). Assim, a integridade acrossômica é considerada uma característica seminal importante a ser avaliada (DE LEEUW et al., 1991).

MÉNDEZ et al. (1994) destacam que os danos acrossomais podem ocorrer independentemente da motilidade espermática progressiva. Segundo estes autores, espermatozóides com movimento podem ser incapazes de fecundar, devido à liberação precoce das enzimas necessárias para a penetração dos espermatozóides no ovócito.

Segundo STROM et al. (1997), a membrana plasmática e a região acrossomal são as regiões mais atingidas durante o congelamento e descongelamento. Diante disso, pode-se esperar aumento no número de espermatozóides com patologias de acrossoma após o descongelamento.

TASSERON et al. (1977) observaram danos acrossomais em espermatozóides de carneiro, durante todos os estádios do processo de criopreservação (diluição, resfriamento, congelamento e descongelamento), resultando em dano cumulativo de cerca de 40%, detectado por meio de microscopia de luz, e de cerca de 70%, detectado por meio de microscopia eletrônica. De forma semelhante, SODESQUIST et al. (1997), encontraram, encontraram um total de 67,6% de acrossomas intactos pós-descongelamento a 35°C.

A influência dos diluentes no congelamento de sêmen caprino é avaliada principalmente com base na motilidade espermática, integridade acrossomal e taxa de gestação (DEKA e RAO, 1985).

2.7.5 Avaliação de reação acrossômica.

A reação acrossômica é o estágio seguinte à capacitação e, tem como função básica, permitir que os espermatozóides penetrem na zona pelúcida, fundindo-se à membrana do ovócito (YANAGINACHI, 1994). Este processo caracteriza-se por pontos múltiplos de fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa. À medida que a reação progride, formam-se orifícios que permitem o efluxo de enzimas acrossomais, principalmente acrosina e hialuronidase envolvidas na penetração no ovócito (YANAGINACHI, 1989). Os locais onde estas fusões se iniciam são aquelas onde a membrana acrossomal externa é menos estável e onde há maior quantidade de sítios de ligação para o cálcio (YANAGINACHI, 1994).

As conseqüências da desestabilização das membranas após o congelamento ou criopreservação pode ser a reação acrossômica prematura, reduzindo o tempo de vida do espermatozóide e as taxas de fertilidade após a inseminação transcervical (MARSHBURN et al., 1992). IBORRA et al. (2000) demonstram que o efluxo de colesterol e a desestabilização da membrana espermática estão envolvidas com a capacitação e a reação acrossômica, e que a remoção do colesterol promoveria o

início da reação acrossômica, além da presença de plasma seminal prevenir a capacitação e a reação acrossômica

Segundo WATSON (1995), várias alterações na funcionalidade das membranas espermáticas vêm sendo observadas no espermatozóide criopreservado humano (CRITSER et al., 1988) e de carneiro (VASQUEZ, citado por WATSON, 1995), que exibiram alta penetração na zona pelúcida imediatamente após o descongelamento. Uma possível explicação, segundo HAMMERSTED e GRAHAM (1992), seria pela interação do glicerol com a célula, que promoveria modificações na organização e funcionalidade da membrana lipídica espermática e posterior reação acrossômica.

A frequência da reação acrossômica pode ser determinada por meio de coloração com eritrosina-ácido flaviânico, ou giensa-trypan blue, ou ainda, trypan blue-neutral red-giensa, em esfregaços previamente preparados (SILVA, 1998).

Este trabalho teve por objetivo avaliar os possíveis benefícios, que a utilização de dimetil-formamida pode promover na criopreservação de sêmen caprino, seja utilizada de forma isolada ou associada ao glicerol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e animais experimentais

O experimento foi realizado no Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, situada a 20°45'20'' latitude S e 42°52'40'' WGr, altitude média de 725,5m, temperatura média anual de 20,9°C, índice pluviométrico anual de 1.203mm e clima tipo Cwa (inverno seco e verão chuvoso), pela classificação de Köppen (Fonte: CETEC).

O período experimental foi de 15 julho a 20 de setembro de 2004, fora da estação reprodutiva, tendo sido selecionados dois machos adultos da raça Alpina e dois da raça Saanen, clinicamente sadios e de diferentes idades. Todos os animais foram mantidos em baias individuais, recebendo uma dieta formulada para o Setor de Caprinocultura, além de sal mineral e água *ad libitum*.

3.2 Coleta e avaliação física do sêmen

Cada reprodutor foi submetido a três coletas de sêmen semanais, totalizando 5 ejaculados coletados por animal. O método de coleta adotado foi o da vagina artificial com água aquecida entre 42°C e 44°C, tendo como manequim, uma fêmea em estro natural ou induzido. A indução do estro foi realizada pela aplicação semanal de 1,0 mg de benzoato de estradiol* pela via IM. Para cada dia de coleta, utilizaram-se dois machos, alternando a ordem de coleta. O ejaculado foi coletado em tubos graduados de centrifuga plásticos, ao da luz e acondicionados em isopor, a fim de manter a temperatura do recipiente em 37°C durante a coleta.

Após a coleta, o sêmen foi imediatamente colocado em banho-maria a temperatura de 37°C para o exame físico do ejaculado (volume, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática progressiva).

* Estrogin®

O volume do ejaculado foi verificado por visualização direta do sêmen no tubo de centrífuga, graduado e registrado em mililitros (mL), tendo sido o turbilhonamento (escala de 0-5) avaliado pela observação ao microscópio em objetiva de 10x, de uma gota de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida em mesa aquecedora a 37°C. O vigor (escala de 0-5) e a motilidade espermática progressiva (0-100%) foram avaliados pela observação de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula em objetiva de 40x, tal como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal-CBRA (1998).

3.3 Teste hiposmótico (HO)

A integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides foi avaliada antes e depois do congelamento, por meio do teste hiposmótico, utilizando-se 1 mL de solução hiposmótica contendo frutose (100mOsmol/Kg) previamente aquecida a 37°C, acrescida de 10 μ L de sêmen. Esta solução foi incubada por uma hora, em banho-maria a 37°C (FONSECA et al., 2001). Após esse período, as amostras foram fixadas em 250 μ L de solução de formol salina tamponada, para posterior análise em microscopia de contraste de fase, em aumento de 1000x.

Foram avaliadas 200 células e classificadas quanto à presença ou não de cauda enrolada e o resultado foi determinado em percentagem (MELO & HENRY, 1999). As células que apresentavam cauda enrolada foram classificadas como normais, uma vez que reagiram ao meio hiposmótico, já as que não apresentaram esta condição foram classificadas como lesadas.

3.4 Morfologia espermática

Para a avaliação das características morfológicas foi utilizada o método de preparação úmida. Após as coletas, alíquotas de sêmen foram acondicionadas em um frasco contendo formol-salina tamponada (1mL), permanecendo aquecidos a 37°C, e posteriormente estocadas em temperatura ambiente até o dia da avaliação da morfologia dos espermatozóides.

A montagem da preparação úmida consistiu na colocação de uma gota sobre uma lâmina limpa e seca, cobrindo-a com uma lamínula. Foi aplicado sobre este

conjunto um papel filtro pressionando-se suavemente com objetivo de absorção de excesso de líquido. A avaliação foi realizada em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x sob objetiva de imersão. Foram avaliadas 200 células por amostra de ejaculado e o resultado foi expresso em porcentagem de defeitos maiores, menores e totais.

Após os exames físicos e a retirada das amostras para o teste hiposmótico, análise morfológica e concentração, os ejaculados foram destinados às etapas do processo de criopreservação: centrifugação, diluição nos meios tratamentos, envase, resfriamento e congelamento.

3.5 Centrifugação

Após a análise do sêmen "*in natura*" e a retirada das amostras para as análises previamente citadas, o sêmen foi diluído em solução de lavagem Ringer-lactato a 37 °C, na proporção de 1:9, dividido igualmente em três tubos de centrífuga graduados, que corresponderiam a cada tratamento após uma centrifugação, a 600xg durante 10 minutos.

3.6 Diluição e envase

Transcorrido o tempo de centrifugação e descarte do sobrenadante, cada tubo graduado continha um pellet, que foi ressuspendido numa proporção de 1:2 com os meios de congelamento leite desnatado-gema com 7% de glicerol (MIES FILHO, 1982) (Tratamento 1); leite desnatado-gema com 3,5% de glicerol e 3,5% de dimetil-formamida (Tratamento 2) e leite desnatado-gema com 5% de dimetil-formamida (Tratamento 3). Os diluentes foram mantidos em banho-maria a 20 °C, visto que, essa foi a temperatura dos ejaculados após a centrifugação, aferida por termômetro digital.

Após homogeneização sêmen-diluyente, foram avaliadas a motilidade espermática progressiva e vigor, por meio de microscopia em aumento de 400x, seguida da contagem de células para posterior cálculo do número de doses e do volume final de diluyente a ser acrescentado. O cálculo da concentração espermática,

empregou-se a câmara de Neubauer, com sêmen diluído na proporção de 20 microlitros para 4,0 mL de solução formol-salina tamponada (HANCOCH, 1957).

A concentração da dose usada foi de 100 milhões de espermatozóides em palhetas de 0,5 mL. As palhetas foram envasadas por aspiração, sendo que essa aspiração foi realizada por meio de um sonda acoplada à uma seringa de 10mL e identificadas de acordo com o tratamento, utilizando massa de modelar atóxica.

3.7 Resfriamento

O sêmen foi resfriado no interior de uma caixa de isopor, segundo metodologia descrita por BUENO (2000) para o congelamento de sêmen canino, com pequenas alterações. As palhetas de todos os tratamentos foram colocadas em um frasco de vidro mantido a 20 °C e medindo 15 cm de altura e cinco cm de diâmetro, que foi fechado para evitar contato com água. Este frasco foi colocado dentro de outro recipiente de plástico, com 20 cm de altura e 12 cm de diâmetro, contendo 1500 mL de água a 20 °C. Ambos os recipientes foram acondicionados na caixa de isopor, previamente preparada com 3,0 litros de gelo e 3,5 litros de água a 20 °C. A caixa de isopor de formato quadrangular possuía as seguintes dimensões: 32,5 cm de altura, 2,0 cm de espessura e 30,0 cm de comprimento.

O sêmen foi resfriado a partir da temperatura inicial de 20 °C atingindo em 40' a temperatura final de 5,0 °C. A queda de temperatura da água em contato com o frasco de vidro, contendo as palhetas foi aferida por meio de termômetro digital, durante esse período. Em seguida, o frasco de vidro, ainda contendo as palhetas, foi acondicionado dentro de uma geladeira, que mantinha temperatura interna de 4,5 °C, por 1:20h (período de equilíbrio).

3.8 Congelamento

Após o período de equilíbrio, as palhetas foram colocadas horizontalmente sobre uma grade, 5 cm acima da lâmina de nitrogênio líquido, em caixa de isopor apropriada. As palhetas permaneceram por 15 minutos no vapor de nitrogênio líquido e, após esse período, foram mergulhadas em nitrogênio a -196 °C, sendo o armazenamento realizado em botijões de sêmen.

3.9 Descongelamento e teste de termo-resistência lento.

As amostras foram descongeladas a 37 °C por 50 segundos e acondicionadas em tubos *ependorf*, previamente aquecidos em banho-maria a 37 °C, para a realização do teste de termo-resistência lento (TTR).

O teste de termo-resistência lento foi realizado de acordo com o protocolo preconizado pelo CBRA (1998), no qual o sêmen descongelados foram cobertos com óleo mineral pré-aquecido e incubados a 37 °C, durante o período de 2 h. Desta forma, foram avaliados a motilidade e o vigor espermático por meio de microscopia de contraste de fase acoplado, em aumento de 400x nos tempos zero; cinco; 60 e 120 minutos.

3.10 Avaliação de integridade acrossômica

A retirada de amostras seminais para a avaliação dos danos acrossomais foi realizada no início e no final do TTR. Assim, uma alíquota (10 µL) de sêmen de cada partida foi acondicionada em tubo *ependorf*, com solução de formol-salina tamponada (HANCOCH, 1957). Posteriormente, confeccionou-se a preparação úmida da amostra de sêmen entre lâmina e lamínula. Essa análise foi realizada por meio de microscopia de contraste de fase, em aumento de 1000x e sob imersão (SODERQUIST et al., 1997). Foram avaliadas 200 células de cada amostra, considerando lesionadas as células espermáticas que apresentavam edema e desprendimento parcial ou total de acrossomal.

3.11 Reação acrossômica

A reação acrossômica foi avaliada por meio de esfregaços das partidas descongeladas e de acordo com a metodologia de coloração adotada por BRYAN e AKRUK (1977). Para a realização deste protocolo, três soluções estoques foram preparadas: solução A (0,1% de naftol amarelo em uma solução de ácido acético a 1% em água destilada), solução B (0,2% de naftol amarelo em água destilada) e solução C (0,2% de eritrosina B em água destilada).

As lâminas contendo os esfregaços ficaram imersas durante 30 minutos na solução A. Posteriormente foram lavadas por 15 segundos em ácido acético a 1% em água destilada, secas ao ar e imersas por 7 minutos em uma solução 1:1 das soluções B e C (ajustando o pH desta mistura para 4,6 a 5,0 com ácido acético) e secas ao ar.

Os espermatozóides com reação acrossômica aparecem pálidos na região do acrossoma e aqueles que não reagiram, em cor rósea ou púrpura (LENZ et al., 1993). Foram contados 100 espermatozóides, em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1000x, sendo avaliado o percentual de espermatozóides com acrossoma reagido.

3.12 Análises estatísticas

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade (Lilliefors) e homocedasticidade (Cochran e Bartlett). Posteriormente, foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Apresentando significância, foi realizado o teste de comparação de médias de Duncan, a 5% de probabilidade de erro (SAEG, 1999).

As variáveis que não atenderam às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações, foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (SAEG, 1999).

A correlação simples de Pearson foi utilizada para verificar as relações entre as características estudadas (SAEG, 1999). As médias e desvio padrão foram observados por meio da estatística descritiva.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características seminais no pré-congelamento

As características físicas e morfológicas do sêmen “*in natura*” de todos os animais utilizados neste experimento estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Média (M) e desvio-padrão (DP) das características físicas do sêmen “*in natura*” de bodes da raça Alpina e Saanen.

Animal	Volume (mL) M±DP	Turbilhonamento (%) M±DP	Motilidade (%) M±DP	Vigor (1-5) M±DP	Concentração (x10 ⁹ /mL) M±DP
1	1,2±0,4	4,0±0,0	87,0±7,0	3,7±0,2	1,80±0,33
2	0,8±0,6	3,8±0,3	90,0±6,5	3,4±4,3	1,32±0,59
3	0,8±0,2	4,1±0,2	90,0±4,6	4,0±0,3	2,11±0,54
4	0,8±0,2	4,0±0,3	95,2±3,2	3,9±0,7	1,80±0,27
Geral	0,9±0,1	3,9±0,1	90,5±2,9	3,7±0,2	1,70±0,00

Tabela 2- Percentagem média de defeitos maiores, menores e totais do sêmen de bodes da raça Alpina e Saanen.

	Animal			
	1	2	3	4
Defeitos Maiores	0,4±0,2	-	0,2±0,4	2,0±0,0
Defeitos Menores	3,2±4,3	3,2±3,7	3,7±4,1	3,8±4,0
Defeitos Totais	3,6±1,74	3,2±0,7	3,9±1,69	5,8±4,0

4.2. Características seminais no pós-descongelamento

Todas as partidas descongeladas apresentaram requisitos superiores aos exigidos para sêmen descongelado, no que se refere aos aspectos de motilidade e vigor pós-descongelamento, de acordo com as exigências do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

A motilidade média pós-descongelamento, independente do tratamento foi de 61,0%. Entretanto, essa variável isoladamente não deve ser associada com possíveis taxas de prenhez, uma vez que SIQUEIRA (2004) relata correlação negativa entre a motilidade espermática pós-descongelamento e a taxa de fertilidade ($r:-0,22$). Da mesma forma, CORREA et al (1997b) não observaram diferença entre a motilidade espermática pós-descongelamento, em touros com baixa e alta fertilidade. Estes fatos podem ser explicados, pelas lesões de membrana e de acrossoma que ocorrem, durante o processo de criopreservação, independentemente da motilidade (BARBOSA, 1999).

Foi observada uma perda de 30,0% da motilidade inicial, valor menor ao observado por MCLAUGHLIN et al. (1992), que verificaram ter o processo de criopreservação diminuído a motilidade média dos espermatozóides em cerca de 40% dos valores iniciais, com redução maior no sêmen de pior qualidade. Esse declínio da motilidade pós-descongelamento é esperado, uma vez que o processo de criopreservação pode diminuir a viabilidade espermática, além de promover danos estruturais não correlacionados diretamente e inicialmente com a motilidade (WATSON, 1995).

Um dos fatores que limita a fertilidade do sêmen criopreservado é o período de sobrevivência destes após o descongelamento, que pode ser avaliado pelo teste de termo-resistência lento. Neste trabalho, a motilidade espermática média observada ao final do TTR foi de 14,2% (Tabela 3).

A queda da motilidade espermática observada ao final do TTR pode ser decorrente da perda dos componentes intracelulares ou de lesões estruturais das membranas das células espermáticas, provenientes tanto dos processos de congelamento, quanto do descongelamento. WATSON (1995) citado por SIQUEIRA (2004) relata que embora o declínio da motilidade espermática possa ser explicado com base nas mudanças do transporte ativo e permeabilidade de membrana

plasmática dos espermatozoides, é também possível que alterações na energia disponível ou danos nos elementos do axonema possam contribuir para esse fenômeno.

A motilidade espermática pós-descongelamento não foi afetada ($P>0,05$) pelos diferentes crioprotetores (Tabela 3). Esse resultado difere do observado por KEITH (1998), que ao avaliar o glicerol e diferentes amidas, entre elas a dimetil-formamida, na criopreservação de espermatozoides eqüinos, observou diferença na motilidade progressiva espermática pós-descongelamento entre os tratamentos. Segundo essa autora, o sêmen criopreservado com glicerol teve motilidade pós-descongelamento superior aos demais crioprotetores estudados ($P<0,05$). Esses distintos resultados podem estar associados tanto a diferença de metodologia aplicada para a criopreservação, como o período de equilíbrio mais prolongado adotado por esta autora, quanto à características intrínsecas do sêmen da espécie envolvida.

Tabela 3 – Média e desvio-padrão da motilidade espermática progressiva, durante o teste de termo-resistência lento, de sêmen congelado com três diluentes, em caprinos da raça Alpina e Saanen.

Tempo de incubação (minutos)	Tratamentos		
	1	2	3
	M±DP	M±DP	M±DP
0	67,8±15,8 ^a	61,1±28,0 ^a	53,6±23,1 ^a
5	53,5±21,7 ^a	56,6±21,3 ^a	42,1±23,5 ^a
60	32,2±22,0 ^a	43,3±28,4 ^a	34,7±23,8 ^a
120	14,2±3,0 ^a	36,9±27,8 ^b	22,1±21,5 ^{ab}

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem entre si ($P<0,05$), pelo teste de Duncan. MP- motilidade progressiva. Tratamento 1- diluente leite desnatado-gema com 7% de glicerol; Tratamento 2- diluente leite desnatado-gema com 3,5%de glicerol e 3,5% de dimetil-formamida; Tratamento 3- diluente leite desnatado-gema com 5% de dimetil-formamida.

Ao final do TTR, as partidas congeladas com a associação de glicerol e dimetil-formamida apresentaram motilidade espermática superior, quando comparadas com as congeladas com glicerol ($P<0,05$), porém não apresentaram diferença significativa das partidas que continham a dimetil-formamida, como único

crioprotetor ($P>0,05$) (Tabela 3). Este fato pode estar associado à boa proteção que a combinação de crioprotetores pode oferecer na criopreservação celular, quando comparada com o uso isolado de crioprotetores (DALIMATIA e GRAHAM, 1997).

No bode, a remoção do plasma seminal, por meio da centrifugação, aumenta a percentagem de células vivas e a motilidade espermática progressiva após a criopreservação em diluentes à base de gema de ovo ou leite (LEBOEUF et al., 2000). Assim, foi observada correlação positiva entre a porcentagem de células integras no pós-descongelamento com a motilidade espermática progressiva retílinea observada em diferentes períodos da criopreservação ($P<0,05$). Segundo TULY e HOLTZ (1994) e SIMPLÍCIO e MACHADO (1995) a presença de plasma seminal de caprinos é desfavorável à congelabilidade, sendo que a sua remoção promove maior sobrevivência dos espermatozóides pós-descongelamento.

O processo de criopreservação do sêmen causa danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozóides, resultando na redução da motilidade e viabilidade espermática (LEBOEUF et al., 2000). Desta forma, foi observada redução do vigor das células criopreservadas, quando comparadas ao exame do sêmen “*in natura*”, entretanto, essa variável não diferiu entre os tratamentos ($P<0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Média e desvio padrão do vigor espermático no pós-descongelamento, submetidos ao teste de termo resistência lento, de sêmen de bodes da raça Alpina e Saanen, criopreservados em três diferentes diluentes.

Tempo de incubação (minutos)	Tratamentos		
	1	2	3
0	3,6±0,4 ^a	3,3±0,7 ^a	3,2±0,8 ^a
5	3,2±0,4 ^a	3,2±0,7 ^a	3,0±0,7 ^a
60	2,5±0,6 ^a	2,9±0,8 ^a	2,6±0,8 ^a
120	1,8±0,6 ^a	2,5±0,9 ^a	2,1±0,9 ^a

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,05$).

Tratamento 1 – diluente leite desnatado-gema com 7% de glicerol

Tratamento 2 – leite desnatado-gema com 5% de dimetil-formamida

Tratamento 3 – diluente leite desnatado-gema com 3,5 glicerol e 3,5% de dimetil- formamida.

SANTOS (2003) utilizando o mesmo procedimento de descongelamento realizado neste trabalho, não observou diferença no vigor pós-descongelamento, ao utilizar 5% de dimetil-formamida e etilenoglicol na criopreservação de espermatozóides caninos. Contudo, ao realizar o descongelamento por 75°C por sete segundos, seguido de estabilização 37°C por um minuto, houve superioridade do meio diluente contendo dimetil-formamida a 5%, demonstrando que a etapa de descongelamento tem influência decisiva sobre a viabilidade dos espermatozóides submetidos à criopreservação.

Os resultados do TTR, em geral, evidenciaram uma queda linear dos parâmetros de motilidade espermática progressiva e vigor, ao longo de duas horas de duração do teste, como demonstram as figuras 1 e 2. Sendo, que este comportamento também foi observado por SIQUEIRA (2004), ao avaliar partidas de sêmen descongeladas de touros.

DIMITROPOULUS (1972) citado por BARNABÉ (1981) observaram, por meio da avaliação de sêmen criopreservados de touros no teste de termo resistência, baixa percentagem de espermatozóides com movimentos progressivos (5%), associados com baixa fertilidade.

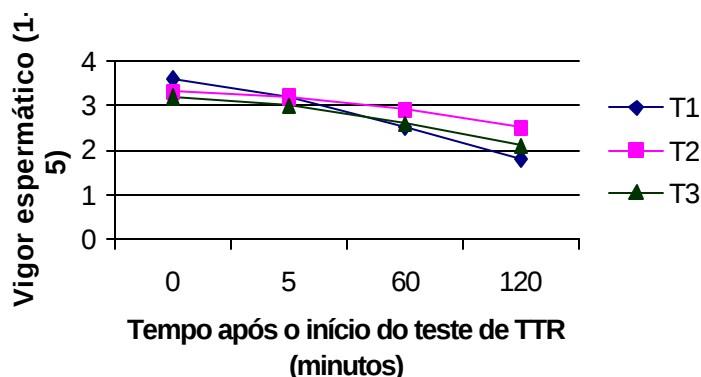


Figura 1 – Vigor espermático de sêmen descongelado de bodes da raça Alpina e Saanen, congelados em três diferentes diluentes e submetidos ao teste de termo-resistência lento.

T1 – dilúente leite desnatado-gema com 7% de glicerol.

T2 – dilúente leite desnatado-gema com 3,5 glicerol e 3,5% de dimetil-formamida.

T3 – leite desnatado-gema com 5% de dimetil-formamida.

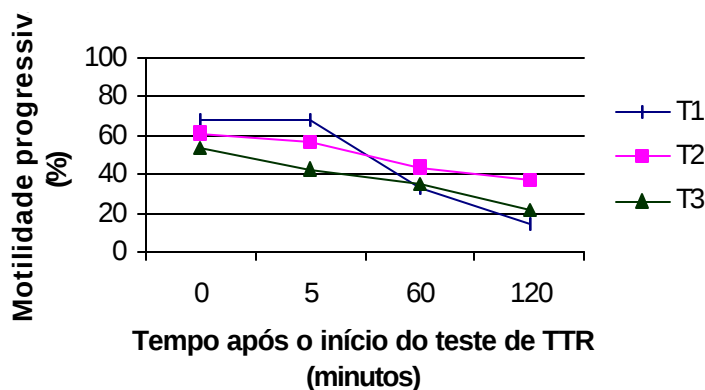


Figura 2 – Motilidade espermática progressiva de sêmen descongelado de bodes da raça Alpina e Saanen, congelados em três diferentes diluentes e submetidos ao teste de termo-resistência lento.

T1 – dilúente leite desnatado-gema com 7% de glicerol.

T2 – dilúente leite desnatado-gema com 3,5 glicerol e 3,5% de dimetil-formamida.

T3 – leite desnatado-gema com 5% de dimetil-formamida.

A concentração de dimetil-formamida utilizada neste experimento foi escolhida com base nos valores, com os quais esse crioprotetor vem sendo utilizado para outras espécies. MEDEIROS et al. (2002) e GOMES et al. (2002) sugeriram a utilização da dimetil-formamida a 5% para a preservação dos espermatozoides eqüino. Já, VIDAMENT et al. (2002) observaram decréscimo da vitalidade dos espermatozoides eqüino com a utilização de dimetil-formamida a 5%, sendo que a concentração de 2% apresentou melhores resultados. Estes resultados demonstram a necessidade de estudos das diferentes concentrações de dimetil-formamida para a criopreservação espermática, levando-se em conta a espécie estudada.

4.3. Integridade funcional da membrana plasmática

A integridade funcional da membrana plasmática, principalmente da cauda, foi avaliada utilizando o teste hiposmótico (HO), que possibilita analisar a capacidade do espermatozoide de reagir em um meio hipotônico, quando o mesmo possui membrana plasmática funcionalmente ativa. O influxo de água é observado mais

facilmente na região da cauda, sendo caracterizado pelo seu enrolamento (JEYENDRAN et al., 1984; KUMI-DIAKA, 1993).

Após o procedimento de criopreservação espermática foi observada uma perda da integridade celular de 19%, que pode ser tanto atribuída às lesões normalmente esperadas após a criopreservação, quanto ao procedimento de centrifugação. Adicionalmente, este valor pode ser considerado baixo, quando comparado com a perda de 30% relatada por SANTOS (2003).

SANTOS (2001) observou uma perda de 14,3% de integridade de membrana plasmática entre o sêmen "*in natura*" e descongelado da espécie caprina. Entretanto, a osmolaridade utilizada pelo autor foi de 60 mOsmol/Kg, diferente da utilizada neste experimento, de 100 mOsmol/Kg. Segundo FONSECA et al. (2001) a osmolaridade de 100 e 150 mOsmol/L são mais eficazes para a avaliação de sêmen caprino descongelado, visto que, promove maior percentagem de caudas dobradas.

Segundo Hossain et al. (1998) citado por SIQUEIRA (2004) a resposta mediana observada ao teste hiposmótico após a criopreservação pode estar associada aos danos que a cauda espermática sofreu durante o congelamento e o descongelamento, o que diminui a capacidade dos espermatozóides de reagirem com o aumento do volume celular, em resposta à baixa osmolaridade. Além disso, o próprio meio de congelamento pode induzir ao estresse osmótico, o que resultaria em lesões da estrutura celular (CORREA e ZAVOS, 1994).

BITTENCOURT (2003) observou menores percentuais de células reativas a teste hiposmótico, quando utilizou 7% de glicerol para criopreservação de sêmen caprino. Contudo, no presente estudo, o tratamento que continha este crioprotetor não diferiu dos demais em relação ao percentual de células reativas ao teste hiposmótico ($P>0,05$) (Tabela 5), o que pode estar relacionado provavelmente a uma melhor proteção do diluente leite desnatado-gema durante a criopreservação, uma vez que BITTENCOURT (2003) utilizou o diluente Tris-gema. Os fosfolípidios presentes no leite (QUINN e WHITE, 1966) e na gema de ovo (WATSON, 1995) interagem com a membrana plasmática, promovendo alterações estruturais na membrana plasmática dos espermatozóides, permitindo com isso, sua adaptação a baixas temperaturas.

Foi observada correlação positiva (0,5) entre a percentagem de células reativas ao hiposmótico pós-descongelamento com motilidade espermática progressiva e vigor no sêmen “*in natura*”(P<0,05). Estes resultados demonstram a real influência da integridade espermática sobre os parâmetros motilidade espermática progressiva e vigor espermático.

Tabela 5 –Média e desvio padrão de espermatozóides íntegros em sêmen “*in natura*” e pós-descongelamento, observados no teste hiposmótico e diferentes diluentes de criopreservação em bodes da raça Alpina e Saanen.

Tratamentos	H.O.F	H.O.D
	M±DP	M±DP
1	73±11,7 ^a	57±14,2 ^a
2	73±11,7 ^a	54±16,3 ^a
3	73±11,7 ^a	52±14,4 ^a

Médias com letras iguais sobrescritas na mesma coluna não diferem entre si (P>0,05).

H.O.F. - células espermáticas reativas ao hiposmótico do sêmen *in natura*.

H.O.D- células espermáticas reativas ao hiposmótico do sêmen descongelado.

Tratamento 1- diluente leite desnatado-gema com 7% de glicerol.

Tratamento 2- diluente leite desnatado-gema com 3,5%de glicerol e 3,5% de dimetil-formamida.

Tratamento 3- diluente leite desnatado-gema com 5% de dimetil-formamida

Foi observada relação positiva entre a motilidade espermática progressiva, avaliada durante o TTR e percentagem de células reativas ao hiposmótico pós-descongelamento (P>0,01). Da mesma forma, MELO (1999) observou valores médios de relação entre o teste hiposmótico e a motilidade espermática. Contudo, PENÃ & LINDE-FORBERGS (2000) citam que o período de incubação é mais deletério para a motilidade espermática que para a integridade da membrana dos espermatozóides. Segundo ROTA et al. (1997) este fato ocorre porque o decréscimo na população de células íntegras estaria relacionado aos danos latentes causados pelo congelamento ou descongelamento e não ao tempo de incubação propriamente.

4.4. Integridade Acrossômica

O acrossoma parece ser especialmente afetado pelo choque de temperatura e pode exibir características como edemas, vacuolizações e até desprendimento do

segmento equatorial (WATSON, 1996). Assim, estas condições foram esperadas e observadas durante as análises no presente estudo.

Foi observado um aumento de 3% nos danos acrossomais (Tabela 6), durante o TTR lento. Similar resultado foi também observado no experimento realizado por SANTOS (2001), durante a criopreservação de sêmen caprino e seguindo a mesma metodologia de avaliação. Segundo este autor, a integridade da membrana espermática diminui com a elevação da temperatura.

Os valores médios para os percentuais de acrossomas lesados, observados no início e no fim do TTR encontram-se sumarizados na Tabela 6, sendo que os danos acrossomais não diferiram entre os diferentes crioprotetores ($P>0,05$). Resultados diferentes foram observados por MEDEIRO et al. (2003) e KEITH (1998), que comentaram a superioridade das amidas, como a dimetil-formamida, em relação ao glicerol na manutenção da integridade acrossômica. Segundo esses autores, a eficiência das amidas pode estar relacionada ao seu menor peso molecular em relação ao glicerol, conferindo-lhe uma maior permeabilidade de membrana plasmática e acrossomal.

Independente do tratamento, o valor médio de lesões acrossômicas observado (8,0%) foi muito inferior aos 22% relatados por BARBOSA (1999) estando porém, mais próximo da média observada por MÉNDEZ et al. (1994), que foi de 9,2%. Possivelmente, estes diferentes resultados podem estar associados às diferentes metodologias utilizadas, como a não retirada do plasma seminal e as características avaliadas durante os exames microscópicos.

O processo de descongelamento pode ser tão deletério, quanto o congelamento. Assim, a metodologia de descongelamento influencia a viabilidade dos espermatozóides pós-descongelamento (PENÃ e LINDE-FORSBERG, 2000). SODERQUIST et al. (1997) avaliando a integridade acrossomal de espermatozóides de carneiros descongelados a 35°C, observaram média de 67,6% de acrossomas intactos. Já, no presente estudo, após o descongelamento a 37°C foi observado inicialmente 95% de acrossomas intactos. Estes valores devem ser considerados, visto que a motilidade progressiva associada aos danos acrossomais podem ser

considerados como indicadores da capacidade fertilizante do sêmen (MÉNDEZ et al., 1994).

SANTOS (2003) pela criopreservação de sêmen canino, observou alto percentual de patologias de acrossoma pós-descongelamento (26,3%), principalmente edema, quando utilizou dimetil-formamida a 5%. Entretanto, no presente estudo, esse alto percentual de patologias acrossômicas não foram observadas, quando foram utilizados esse mesmo crioprotetor e mesma concentração no tratamento realizado (Tabela 7), demonstrando os possíveis benefícios que a dimetil-formamida pode promover na criopreservação da célula espermática caprina, em relação a sua utilização para a espécie canina.

Tabela 6 – Média e desvio padrão das lesões acrossômicas no início e no final do teste de termo-resistência lento, em sêmen de bodes da raça Alpina e Saanen, criopreservados com diferentes diluentes.

Tratamento	L.A. TTR0	L.A. TTR120
1	5,0±5,2 ^a	7,4±6,4 ^a
2	5,0±4,0 ^a	8,3±6,5 ^a
3	5,0±5,9 ^a	8,2±6,3 ^a
Média	5,0±5,3	8,0±6,4

L.A.TTRO - lesões acrossômicas no início do TTR (0,0h).

L.A. TTR120 – lesões acrossômicas no fim do TTR (1,0h).

Tratamento 1- Leite desnatado-gema com 7% de glicerol;

Tratamento 2-Leite desnatado-gema com 3,5% de glicerol com 3,5% de dimetil-formamida;

Tratamento 3- Leite desnatado-gema com 5% de dimetil-formamida.

Médias com letras iguais sobrescritas na mesma linha e na mesma coluna não diferem entre si (P>0,05).

4.5. Reação acrossômica.

Segundo SILVA (1998), o teste de reação acrossômica é um indicador do potencial de fertilidade de touros zebuínos, comprovado pela relação existente com a taxa de prenhez a campo, além de correspondente taxa de fecundação “*in vitro*”. O teste é útil para a indústria de produção de sêmen congelado não só por complementar, mas também pela superioridade a outros testes comumente relacionados ao exame andrológico.

O índice médio de reações acrossômicas observadas foi de 24,8%, valor intermediário aos 14% e 34% (SILVA, 1998) e superior aos 9,85% (SIQUEIRA, 2004) observados em sêmen criopreservados de touros. Sendo que o último autor não observou correlação significativa entre este teste e fertilidade. Esse valor médio de reação acrossômica opõe-se ao elevado número de espermatozoides, que mantiveram a integridade acrossômica, pós-descongelamento.

A frequência da reação acrossômica das amostras pode ser observada na Figura 3, sendo determinadas pela coloração com eritrosina-ácido flaviânico, sendo que não se observou diferença ($P > 0,05$) entre os diferentes crioprotetores.

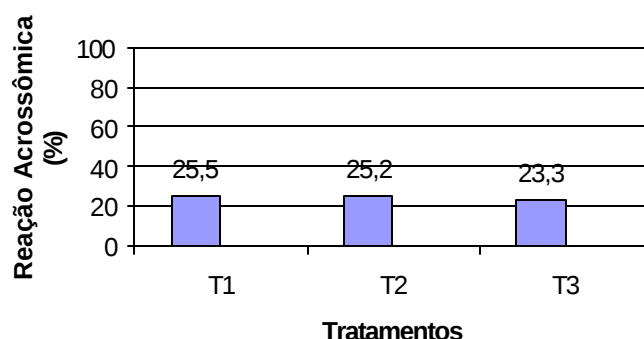


Figura 3- Percentagem de reação acrossômica em sêmen descongelado de bodes das raças Alpina e Saanen, congelados com diferentes diluentes.

Tratamento 1- Leite desnatado-gema com 7% de glicerol;

Tratamento 2- Leite desnatado-gema com 3,5% de glicerol com 3,5% de dimetil-formamida;

Tratamento 3- Leite desnatado-gema com 5% de dimetil-formamida.

Os maiores valores para motilidade pós-descongelamento foram associados com superiores percentagens de células que reagiram ao teste. Resultados semelhantes foram observados por BARNABÉ et al. (1981b) que inferiram altos valores de motilidades progressiva associadas a maiores percentagens de acrossomas normais. Entretanto, SIQUEIRA (2004) relatou correlação negativa para o teste de reação acrossômica e a motilidade progressiva espermática pós-descongelamento.

O teste de reação acrossômica induzida indica a população de células da partida, que teriam estas modificações no trato reprodutivo da fêmea, além disso, tem alta correlação com a taxa de fertilidade (SILVA, 1998).

O alto índice de células, que não reagiram ao teste, demonstraram que houve reação acrossômica precoce, durante a criopreservação e pode estar relacionado à dois fatores: a desestabilização prematura da membrana espermática, devido ao processo de criopreservação (WATSON, 1995) e ausência de plasma seminal nas amostras criopreservadas, uma vez que a remoção do plasma seminal torna o espermatozóide mais susceptível à fatores, que induzem a reação acrossômica precoce (IBORRA et al., 2000).

A conseqüente desestabilização das membranas, pelo processo de criopreservação, sendo responsável pela reação acrossômica prematura dos espermatozoides, tem sido associada com queda da viabilidade dos espermatozoides e redução da sua fertilidade, após a inseminação (WATSON, 1995). Clarke e Jhonson 1987, citados por WATSON (1995) verificaram aumento na proporção de espermatozoides de bodes, com acrossomas reagidos no pós-descongelamento entre a população selecionada pelo “swim-up”, visto que houve penetração espermática “*in vitro*”, sem nenhum período de incubação.

O tratamento contendo o glicerol, como único crioprotetor, apresentou maior número de células espermáticas reativas ao teste de reação acrossômica, confirmando a correlação negativa observada por SIQUEIRA (2004) para o teste de reação acrossômica e a motilidade espermática progressiva pós-descongelamento.

O diluente utilizado à base de gema de ovo pode ter contribuído para os baixos índices de reação acrossômica induzida, uma vez que a utilização de diluentes com essa base reduzem a percentagem de reação acrossômica induzida (BIELFELD et al., 1990).

5. CONCLUSÕES

A dimetil-formamida pode ser uma alternativa, como crioprotetor isolado ao associado ao glicerol, mantendo a qualidade espermática caprina, após a criopreservação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAMDAL, J.; LYGSET, O.; FOSSUM, K.; Toxic effect of lysolecithin on sperm. **Nordisk Veterinary Medicine.**, v.17, p.633-634, 1965.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.
- ANDRADE, S.J. **Sêmen caprino congelado: efeito de dois diluidores sobre a taxa de fertilidade**. Belo Horizonte. MG: UFMG. 1996, 53f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.
- ANDREEV, V.; SAKHATSKII, N.; OSTASHKO, F. Cryopreservation of gander semen. **Animal Breed Abstract**, v.52, p.704, 1984.
- ANGOLA, A. P. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de sêmen. **Veterinary Mexican.**, v.25, p.207-210, 1994.
- ANUALPEC 2004. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Argos Comunicação, 2004. 400p.
- ATREJA, S.K.; ANAND, S.R. Phospholipase and lysophospholipase activities of goat spermatozoa in transit from de caput to the tail epididymis. **Journal Reproduction Fertility**, v.74, p.687-691, 1985.

AZAWI, O.I.; AL-DAHSAH, S.Y.A.; JUMA F.T. Effect of different diluents on shami goat semen. **Small Ruminant Research**, v.9, p.347-352, 1993.

BARBOSA, L.P. **Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen, em programas de inseminação artificial em caprinos da raça Alpina**. Viçosa, MG:UFV.1999. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Viçosa, 1999.

BARNABÉ, V.H., BARNABÉ, R.C.; VISITIN, J.A. Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termo resistência para avaliação de sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.4 (3-4), p.7-12, 1981.

BARNABÉ, R.C.; BARNABÉ, V.H.; VIANA, W.T. et al. Correlações entre motilidade progressiva e retenção de acrossoma em sêmen de bovinos, pós-descongelamento e após provas de termo-resistência. **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.18, p.61-68, 1981b.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J. et al. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.48, p.391-410, 1997.

BERLINER, V.R. Dilutors for stallions and jack semen. **Journal Animal Science**, v.1, p.314-319, 1942.

BIELFELD, P.; JEYENDRAN, R.S.; HOLMGREN, W.J.; ZANEVELD, L.J. Effect of egg yolk medium on the acrosome reaction of human spermatozoa. **Journal Andrology**, v.3, p.260-269, 1990.

BITTENCOURT, F.R. **Criopreservação de sêmen caprino com a utilização do glicerol e etilenoglicol associados ou não ao EDTA**. Salvador, BA: UFBA. 2003. 66f. Dissertação (Graduação em Medicina Veterinária)- Universidade Federal da Bahia, 2003.

BLANCO, J.M.; GEE, G.; WILDT, D.E.; DONOGHUE, A.M. Species variation in osmotic cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1167-1171, 2000.

BOGART, R.; MAYER, D.T. The effect of egg yolk on various physical and chemical factors detrimental to spermatozoa viability. **Journal Animal Science**, v.9, p.143-152, 1950.

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

BOYDE, E.N.; PERKINS, J.R.; OLDS, D. The longevity of bovine spermatozoa in chemical and heat-treated pasteurized milk. **Journal Dairy Science**, v.37, p.650, 1954.

BRYAN, J.H.D.; AKRUK, S.R. A naftol yellow and erithrosin B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. **Stain Technology**, v.52, p.47-51, 1977.

BUENO, R. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento**. Viçosa, MG: UFV. 2000. 91f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Viçosa, 2000.

BUHR, M.M.; CURTS, E.F.; KAKUDA, N.S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v.31, p.224-238, 1994.

CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P. Ação crioprotetora do glicerol e etilenoglicol no congelamento do sêmen de cão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.174-176, 2002.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal** (2ed), Belo Horizonte, CBRA, 1998. 49p.

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

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

CORTEEL, J.M.; BARIL, G. Effect du “lavage” sur la conservation des spermatozoides du bouc a basse temperature. **Animal Biology Biochemical Biophysics**, v.15, p.525-8, 1975.

CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoïdes de boue conserves et congelés avec ou sans leur plasma seminal: effect du glucose. **Ann Biology Animal**, v.14, p.741-745, 1984.

CORTEEL, J.M. Diminutions saisonnières de la libido, de la quantité et de la qualité de sperm récolte chez le bouc: solutions. **Acta Italiana des Sciences Veterinaries**. v.24, p.1-17, 1985.

CORTEEL, J.M.; LEBEOUF, B.A.; BARRIL, G. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. **Small Ruminant Research**, v.1, p.19-35, 1988.

COTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen eqüino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.14-25, 2002.

CRITSER, J.K.; HUSE-BENDA, A.R.; AAKER, D.V. et al. Cryopreservation of human spermatozoa III. The effect of cryoprotectants on motility. **Fertility and Sterility**. v. 50, p.314-20, 1988.

CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. **Biology Reproduction**, v.41, p.635-641, 1989.

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

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

DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; WOELDERS, H. The fix vital stain method. **Journal Andrololgy**, v.12, p.112-118, 1991.

DEEN DAAS, J.H.G. **Prediction of bovine male fertility**. University of Utrecht, Netherland, 1997, 168f (Tese de doutorado).

DEKA, B.C.; RAO, A.R. Effect of extenders of freezability of buck semen. **Indian Journal Animal Science**, v.55, p.1035-1040, 1985a.

DEKA, B.C.; RAO, A.R. Effect of extenders and thawing methods on post thawing preservation on goat semen. **Indian Veterinary Journal**, v.64, p.591-594, 1987.

DESHPANDE, S.B.; MEHTA, V.M. Effect of dilutors and different glycerol levels on pre-freeze and post-freeze sperm motility and live sperm count in Surti buck semen. **Indian Journal Animal Science**, v.61, p.1093-1095, 1991

DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G. et al. A field study of the fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, p.291-304, 1984.

DROBNIS, E.Z.; NELSON, E.A.; BURRIL, M.J. Effect of several processing variables on motility and glutamic oxalacetic transaminase levels for frozen goat semen. I. Diluent. II. Washing. III. Glycerol level. **Journal Animal Science**, v.51 (Suppl), p.439-440, 1980.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T. et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes. A demonstration using sperm as a model. **Journal Experimental Zoological**, v.265, p.432-437, 1993.

DUNNER, S. Freezing buck semen diluted in amine-organic buffers. **Animal Production**, v.56, p.387-391, 1993

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. Cryopresevation of dog semen: a review. **Journal Reproduction Fertility**, suppl 47, p.243-255, 1993.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dog and foxes. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.145-150, 1996.

FLIPSE, R.J.; PATTON, S.; ALMQUIST, J.O. **Diluters for bovine semen III.** Effect of lactenin and lactoperoxidase upon spermatozoa livability, v.57, p.1205-1211, 1954.

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

FRASER, A.F. A technique for freezing goat semen and results of a small breeding trial. **Canadian Veterinary Journal**, v.3, p.133-143, 1962.

GOMES, G.M.; JACOB, J.F.C.; MEDEIROS, A.S.L. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Machador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.

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

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

HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.60, p.247-252, 1980.

HANCOCH, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal Reproduction Microscopy Social**, v.76, p.84-97, 1957.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HEALEY, P. Effect of freezing on the ultrastructure on the spermatozoa of some domestic animals. **Journal Reproduction Fertility**, v.18, p.21-27, 1969.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid assymetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 26, p. 70-75, 1989.

HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology Reproduction**, v. 46, p.1086-94, 1992.

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

HUBNER, R.; SCHRAMM, G.P. Investigation on the cryoprotective capacity of ethylene glycol and dimethyl-acetamide for the freezing of cock semen. **Animal Breed Abstract**, v. 57, p.265, 1989.

IBORRA, A.; COMPANYÓ, M.; MARTINEZ, P.; MORROS, A. Cholesterol efflux promotes acrossome reaction in goat spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.62, p.378-383, 2000.

IRITANI, A.; NISHIKAWA; Y. Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and the influential condition for coagulation. **Proceedings...**, Silver Jubilee Lab. Animal Husbandry Kyoto University, p.97-104, 1961.

IRITANI, A.; NISHIKAWA; Y. Studies on the egg yolk-coagulating enzyme in goat semen-VIII. The enzyme activity of the semen collected by electrical stimulation and the deplet by the artificial vagina. **Japan Journal Animal Reproduction**, v.10 (2), p.57-62, 1964.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEM H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.

KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. 1998. 116f. Dissertação (Master of Science)- Escola de Veterinária, Universidade Estadual do Colorado, U.S.A.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. et al. **Minimal contamination techniques for breeding mares**: techniques and preliminary findings. Proc. Am. Assoc. Equine Practice, v.21, p.327-336, 1975.

KUMI-DIAKA, J. Subjeting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, p.1279-1289, 1993.

LAKE, P.E.; RAVIE, O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v. 25, p. 145-150, 1984.

LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization testes to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.327-336, 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.

LEITE, E.R. Ovinocaprinocultura: A modernização do Agronegócio. Disponível em: http://www.caprinet.com.br/artigo_11092002-02.shtml Acesso em 20 de Agosto de 2003.

LENZ, R.W.; BALL, G.D.; LOHSE, J.K.; AX, R.L. Condroitin sulfate facilitates the on acrosome reaction in bovine spermatozoa evidence by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v.28, p.683-690, 1983.

LOVELOCK, J.E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochemical.**, v.58, p.618-22, 1954.

LUDWICK, T.M.; OLDS, D.; CARPENTER, M. A method of evaluating bull semen. **Journal Dairy Science**, v.31, p.677, 1948.

MACHADO, R. Inseminação artificial com sêmen congelado em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.1, p.265-276, 1991.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, p.61-72, 1995.

MARSHBURN, P.B.; McINTIRE, D.; CARR, B.R.; BYRD, W. Spermatozoa characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. **Fertility and Sterility**, v. 58, p.179-86, 1992.

MAYER, D.T.; LASLEY, J.F. The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities, and fertilizing capacity of mammalian spermatozoa. **Journal Animal Science**, v.4, p.261-269, 1945.

McLAUGHLIN, E.A.; FORD, W.C.L.; HULL, M.G.R. Motility characteristics and membrane integrity of criopreserved human spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.95, p.527-534, 1992.

McNIVEN, M.A.; GALLANT, R.K.; RICHARDSON, G.F. Dimethyl-acetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, p. 943-948, 1993.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.1-4, 2002.

MEDEIROS, A.S.L.; LANDIN-ALVARENGA; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides de garanhões criopreservados com crioprotetores a base de amidas e glicerol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.353-354, 2003.

MELO, A.C.M.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco e do leite glicosado como diluentes para a congelação do sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9. **Anais**. 1999, p.435.

MELO, M.I.V. **Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino**. Belo Horizonte, MG: UFMG. 1999. 67f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.71-78, 1999.

MEMON, M.A.; OTT, R.S. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. **World Animal Production**, v.17, p.19-25, 1981

MEMON, M.A.; BRETZLAFF, K.N.; OTT, R.S. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. **American Journal Veterinary Research**, v.46, p.473-475, 1985.

MÉNDEZ, J.V.; HERRERA, G.G.; GARCIA, M.E.G.; GONZÉLEZ, A.T. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0,25 ml y 0,5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. **Veterinary Mexican**, v.25, p.127-131, 1994.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5ª ed. Porto Alegre: Sulina, v.2 1982. v.2.

MIHAILOV, N.N. Milk as a diluent for the semen of animals. **Animal Breed Abstract**, v.18, p.24, 1949.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Fundamentos de medicina interna de pequenos animais: **Inseminação artificial e sêmen congelado**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.526-529, 1994.

NUNES, J.F. Exame clínico-andrológico e tecnologia do sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7, 1988. Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: CBRA, p.121-127, 1988.

ORTMAN, K.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa package in plastic bags. **Journal Veterinary Medicine**, v.41, p.37-47, 1994.

PAPA, R.T.C.; SANTOS, F.O.; MACEDO, L.P.; ALVARENGA, M.A.; MELO, CM; DELL'AQUA Jr., J.A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.350-352, 2003.

PELLICER, M.T. **Purificacion y caracterizacion del componente de la secrecion bulbouretral de macho cabrio implicado en el deterioro de la calida de los espermatozoides diluidos en leche.** In: Tesina de Licenciatura. Universidad de Murcia, 200p, 1995.

PENÃ, A; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.544, p.859-875, 2000.

PEREIRA, L.G.M. **Avaliação física e morfológica do sêmen de cães da raça Pastor Alemão resfriado a 5°C.** Belo Horizonte, MG: UGMG. 2000. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal.** 3.ed.Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2001 ,305 p.

PICKETT, B.W. **Seminal extenders and cooled semen.** In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Eds.), Equine reproduction, Malven: Lea & Fabiger, p.746-754, 1993.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal Equine Veterinary Science**; v.7, p.289-302, 1987.

PILIP, R.; DEL CAMPO, M.R.; BARTH, A.D. et al. In vitro fertilizing characteristics of bovine spermatozoa with multiple nuclear vacuoles: a case study. **Theriogenology**, v.56, p.1-112, 1996.

PINTADO, B.; PEREZ LLANO, B.; GIL, L., GUTIERREZ, A. Seasonal evaluation of in vitro viability from goat ejaculates during freezing. In: INTERNATIONAL

CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12, 1992, Amsterdam, Netherlands.
Proceedings..., p.1478-80.

PROVINCE, C.A.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. et al. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.23, p.925-934, 1985.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal Animal Science**, v.37, p.528-535, 1973.

QUINN, P.J.; WHITE, I.G. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major captions in spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.12, p.263-270, 1966.

RESENDE, J.; WEITZE, K.F. Congelamento de sêmen caprino com diluente TRIS modificado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 24, 1987, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1987, p.381.

RITAR, A.J.; BALL, P.D.; O'MAY, P.J. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. **Journal Reproduction Fertility**, v.2, p.27-34, 1990.

ROTA, A.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1997.

ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J. et al. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. **Reproduction Domestical Animal**, v.33, p.355-361, 1998.

SAEG- Sistema de Análises Estatística e Genética. Universidade Federal de Viçosa - UFV, Central de processamento de dados, Viçosa- M.G., 1999.

SANTOS, A.D.F. **Características reprodutivas e congelamento do sêmen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo.** Viçosa, MG: UFV. 2001. 61f. Tese (Mestrado em Zootecnia).Departamento de Zootecnia. Universidade Federal de Viçosa, 2001.

SANTOS, O.E.C. **Viabilidade "in vitro" do sêmen de cão submetido a congelação com diferentes diluidores e crioprotetores.** Belo Horizonte, MG: UFMG. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

SILVA, A.E.D.F. **Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Embrapa, Brasília, 1998.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluentes à base de Tris e água de coco. **Ciência Rural**, v.30, p.1021-1025, 2000.

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

SINGH, L.P.; MEUR, S.K.; PURBEY, L.N. Leakage of transaminase during preservation of buck semen. **Indian Journal Animal Science**, v.63, p.963-965. 1993.

SIQUEIRA, J.B. **Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática "in vitro".**Viçosa, MG: UFV. 2004. 77f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Viçosa, 2004.

SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; SANTOS, L.M.G. Avaliação de crioprotetores no congelamento de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p. 454-455, 2001.

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

SODESQUIST, L.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assesment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**. v.48, p.1115-1125, 1997.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Colorado State University. 1999. 80f. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin. N.9)

STAGNARO, G.C. Insemination artificial in goat by freeze semen. **Zootechnia**, v.24, p.151-163, 1975.

STROM, B.; ROTA, A.; LINDE-FROSBERG, C. "In vitro" characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p.247-256, 1997.

TASSERON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. **Journal Reproduction Fertility**, v.51, p.461-462, 1977.

TISCHNER, M. Problems of semen preservation and artificial insemination in horses. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND

ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, 1988. Dublin. **Proceedings...**Dublin: University College Dublin, v.5, p.354-362, 1988.

THACKER, D.L.; FLIPSED, R.J.; ALMQUIST, J.O. Diluters for bovine semen. II. Effect of milk proteins upon spermatozoa livability. **Journal Dairy Science**, v.37, p.220, 1994.

TULI, R.K.; SCHMIDT-BAULAIN, R.; HOLTZ, W. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. **Animal Reproduction Science**, v.25, p.125-131, 1991.

TULI, R.K.; HOLTZ, W. The effect of zwitterions buffers on the freezability of Boer goat semen. **Theriogenology**, v.37, p.947-951, 1992

TULI, R.K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.42, p.547-555, 1994.

VASCONCELOS, V.A.; VIEIRA, L.S. A EVOLUÇÃO DA CAPRINO-OVINOCULTURA BRASILEIRA. O Berro. n.52, out. de 2002. Disponível em: http://www.zebus.com.br/index_berro.html Acesso em 10 de ago. de 2003.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. et al. Effects of cooling rates and storage temperature on equine spermatozoa motility. **Theriogenology**, v.29, p.143-154, 1988.

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M. et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, v.58, p.249-251, 2002.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E., NEILL, J. **The Physiology of Reproduction**. New York: Ed. Raven Press, p.135-185, 1994.

YANAGIMACHI, R. Sperm capacitation and gamete interaction. **Journal Reproduction and Fertility**, Suppl., v.38, p.27-33, 1989.

WABERSKI, D. Boar seminal plasma and fertility. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 3, 1996, Mariensee, **Proceedings...** Mariensee: 1996, p.87-90.

WAIDE, Y.; NIWA, T.; ASANUMA, R. Studies on the preservation of liquid and frozen semen of domestic animals: III. Viability and fertility of frozen goat spermatozoa. **Japanese Journal Animal Reproduction**, v.23, p.1129-137, 1977.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1, 1985, Uppsala, **Proceedings...**Uppsala, p.113-126, 1985.

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

WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 3, 1996, Mariensee. **Proceedings...**Mariensee: 1996. p.135-140.

WEITZE, K.F.; PETZOLDT, R. Preservation of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p.229-235, 1992.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu-SP : UNESP. 1998. 121f. Tese (Doutorado em

Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista,1998