

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

RODRIGO VASCONCELOS DE OLIVEIRA

Efeito de meios de re-diluição pós-descongelamento sobre a cinética e morfologia de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS

FORTALEZA, CEARÁ

JUNHO, 2007

Rodrigo Vasconcelos de Oliveira

Efeito de meios de re-diluição pós-descongelamento sobre a cinética e morfologia de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes

Co-orientadora: Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro

Fortaleza, Ceará

Junho, 2007

Universidade Estadual do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho: Efeito de meios de re-diluição pós-descongelamento sobre a cinética e morfologia de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS

Autor: Rodrigo Vasconcelos de Oliveira

Defesa em: 27 / 06 / 2007

Conceito obtido: _____

Nota obtida: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Ferreira Nunes
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Orientador

Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
Universidade Estadual do Ceará - UECE
Co-orientadora

Prof. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Examinadora

Prof. Dr. Arlindo Alencar de Araripe Moura
Universidade Federal do Ceará - UFC
Examinador

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que acreditaram nas minhas capacidades. Em especial a minha mãe Elza Maria Vasconcelos de Oliveira, meu pai Carlos Alberto Marques de Oliveira, minha irmã Sabrina Vasconcelos de Oliveira, toda minha família, amigos e à Médica Veterinária Ana Helena Lopes Bento.

HOMENAGEM

Aos meus pais **Elza Maria Vasconcelos de Oliveira e Carlos Alberto Marques de Oliveira**, pela coragem, dedicação, amor e todo sacrifício submetido para que tivéssemos êxito nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me dado saúde, paz, serenidade e coragem durante a realização deste trabalho.

A minha mãe Elza Maria Vasconcelos de Oliveira, pelo apoio incondicional as minhas metas profissionais. Pela mãe amorosa, carinhosa e zelosa. Que por sua excelência na profissão, deu-me a oportunidade de ter uma excelente educação escolar, que proporcionou ao final escolher e ingressar em uma das minhas paixões que é a Medicina Veterinária.

Ao meu pai Carlos Alberto Marques de Oliveira, meu exemplo de caráter. Um homem que tem por excelência a serenidade e inteligência nas resoluções de problemas profissionais e pessoais. Que mesmo distante, continuava a me ajudar a não perder o foco dos meus objetivos. Que ajudou-me a reconhecer a minha capacidade e me desapegar das opiniões e pessoas negativas que por ventura nos deparamos até alcançar nossos objetivos.

À minha irmã Sabrina Vasconcelos de Oliveira, pelo amor, carinho e compreensão quanto ao meu afastamento pelo Mestrado. Pelas alegrias das nossas brincadeiras e travessuras. E pelo exemplo de profissional que trabalha com amor e dedicação.

Mãe, pai e irmã: vocês são os meus heróis. Estar distantes de vocês fisicamente foi sem dúvida a tarefa mais difícil na realização deste trabalho. Amo vocês.

Ao meu orientador, Dr. José Ferreira Nunes, por ter me dado a oportunidade de realizar o Mestrado Acadêmico. Pela orientação e disponibilização das dependências e material do Laboratório de Tecnologia de Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), para realização deste trabalho. Declaro aqui minha admiração pelo seu exemplo de Médico Veterinário e Pesquisador.

À minha co-orientadora Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, que desde meu primeiro dia nas instalações do LTSCO, sempre me prestou ajuda e orientação. Que esteve presente nos meus primeiros ensaios de criopreservação de sêmen caprino, ensinando-me os procedimentos de forma clara e prática. Que teve paciência com as minhas limitações e dificuldades, além de auxiliar a me tornar um profissional mais organizado, característica essencial a um pesquisador. Que

comanda a equipe do LTSCO, representando a figura do Dr. José Ferreira Nunes, com sensibilidade e personalidade. Que não mediu esforços para elaboração, correção e formatação desta dissertação. Meu eterno reconhecimento.

À mestranda Érika da Silva Bezerra de Menezes, minha namorada, pelo amor, respeito e carinho que teve comigo. Por ser uma companheira ímpar nessa caminhada, não medindo esforços para me ajudar, tanto na minha vida pessoal quanto profissional. Que dividiu seus conhecimentos e experiências na Medicina Veterinária, tornando-me um profissional com senso crítico mais apurado nas áreas de clínica e cirurgia de grandes animais. A você minha querida, meu amor e gratidão infundáveis. Jamais irei esquecê-la.

Ao professor Dr. Ailton Alencar de Araújo, por dividir seus conhecimentos e experiências. Pelo exemplo de Médico Veterinário e pesquisador que prima pela ética e coerência nas suas atitudes. Pelas críticas e sugestões, que delinearam meu estudo durante todo Mestrado. Pela confiança e oportunidade ao me convidar a auxiliá-lo no I Curso de Inseminação Artificial em Caprinos realizado na UFERSA, Mossoró-RN, uma das experiências mais gratificantes durante o curso de mestrado.

Ao professor Dr. Arlindo Alencar de Araripe Moura, pelo auxílio na análise estatística dos dados, sugestões e discussão dos resultados da presente dissertação. Sua participação durante a etapa de conclusão do trabalho, sempre de forma clara e objetiva, foi essencial para uma melhor elaboração da dissertação.

Ao mestrando José Maurício Maciel Cavalcante, pela amizade e companheirismo. Por unir suas noções de Física, Química, Biologia e Medicina Veterinária de forma lógica para solução de problemáticas na esfera da reprodução animal, às quais foram fundamentais nos desenvolvimentos do meu conhecimento e senso crítico na área de Tecnologia de Sêmen. Pelos conselhos e críticas durante o Mestrado. Por meio da sua experiência redirecionou as minhas metas de trabalho, quando as emoções dificultavam minhas tomadas de decisões.

À minha orientadora durante a graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Fluminense, a Médica Veterinária Msc Ana Helena Lopes Bento (vulgo Ana Kabrita). Que transformou minha curiosidade e interesse em pequenos ruminantes em uma paixão verdadeira. Que baila nas discussões sobre a Caprinocultura, sempre com sensibilidade, inteligência e bom senso. Que ao longo da graduação, sem que eu tomasse consciência, preparou e lapidou as minhas arestas deficientes para que pudesse estar mais preparado para a seleção e o

desdobrar de um curso de Pós-Graduação. Por sempre ouvir, acreditar e respeitar minhas idéias e opiniões. Que não mediu esforços em me proporcionar oportunidades profissionais. Do seu eterno desorientado, que tanto lhe estima e admira.

À minha tia Sueli Soares e meu amigo Jorge, pela acolhida no período de adaptação aqui em Fortaleza-CE. Este apoio foi fundamental, proporcionando-me tranqüilidade para me estabelecer e, aos poucos, galgar minha independência na cidade. Agradeço em especial quanto à consideração e ao cuidado e por me fazer notar e agradecer as intervenções divinas na minha caminhada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (PPGCV-UECE), por dividirem seus conhecimentos e experiências nas salas de aula. Sendo peças fundamentais no meu crescimento profissional. Em particular a Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva, pela serenidade, clareza e inteligência na transmissão de conhecimento na área de reprodução animal. Um exemplo de docente, que não só dentro da sala aula, mas em conversas informais, sempre procurou solucionar minhas dúvidas e questionamentos.

À doutoranda Maria Gorete Flores Salles, pelo apoio e disponibilização de animais e instalações durante o início do experimento. Pelo respeito, consideração e conselhos durante o mestrado.

Aos funcionários do Lar Antonio de Pádua, pelo auxílio e disposição na realização do início do experimento.

Ao doutorando Marcelo José da Ascensão Feitosa Vieira, pela amizade e convivência agradável e, por sempre trazer contentamento aos meus problemas e dificuldades. Um exemplo de profissional que encara os problemas, procurando sempre ver o lado positivo.

À Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley, pelas sugestões e discussões durante a elaboração e realização do experimento.

Ao funcionário da UECE Valdemir Lemos, pelo ajuda e apoio na realização dos trabalhos de campo. Que sempre alegrou as viagens com histórias e boa música.

Aos colegas do mestrado da turma 2005.2 e 2006.1, pelo convívio agradável e discussões nas salas de aula. Que, sem exceção, formam um grupo seletivo de profissionais bem sucedidos e competentes em suas áreas de conhecimento.

Aos graduandos alunos de iniciação científica do LTSCO, Oscar Oliveira

Brasil, Jullio da Costa Batista Parente, Raphael Fernando Braga Gonçalves, Divens Firmino Reis Souza, Carlos André da Penha Mendes Baptista, Eduardo Amêndola Ribeiro, Edgar Tavares de Assis Neto e Renato Nogueira Diógenes Filho, pela ajuda durante realização da parte prática do trabalho. Por dividirem suas experiências profissionais. Pela coexistência, proporcionando momentos de alegrias e descontração durante o mestrado.

À equipe do LTSCO, nas figuras de: Msc. Maria Audália Marques de Carvalho, mestranda Marcella Moreira Clemente de Mello Pinto, às Biólogas Luciana Rocha Faustino e Nathalie Ommundsen Pessoa, à Médica Veterinária Marina Parissi Accioly, pela convivência e troca de experiências. Sendo peças importantes na adaptação do meu trabalhar em equipe, onde devemos saber conviver com as diferenças pessoais e somar as qualidades individuais para formar um grupo eficiente.

Aos funcionários do PPGCV-UECE, por proporcionarem condições ótimas para o desenvolvimento do mestrado. Em especial ao Selmar, responsável pelo trato e cuidados dos animais e à secretária Adriana, por ser prestativa e bem disposta frente as minhas dúvidas e dificuldades relacionadas ao mestrado.

Aos meus familiares, que sempre incentivaram, apoiaram e acreditaram nas minhas finalidades profissionais. Vocês são a minha base, procurei transformar a saudade em incentivo para representar nossa família com caráter e responsabilidade. Não teria como listar cada um de vocês, sintam-se todos lembrados e considerados, pois é o sentimento que tenho por cada um de vocês.

Aos meus amigos de infância, do jiu-jitsu (*Sandro Marcus Team*) e de faculdade, pela confiança, apoio e incentivo na concretização desta realização profissional. Todos vocês mesmo distantes sempre me auxiliaram a alcançar meus objetivos e valorizaram nossa amizade.

Ao Colégio Palas, minha segunda casa. Que constituiu meus conceitos de cidadania e educação. Que por meio de uma bolsa de estudos integral, desde o maternal ao segundo grau, proporcionou-me a oportunidade de um ensino escolar de excelência, alicerce necessário ao ingresso na Medicina Veterinária, em uma universidade federal. No qual também tive a oportunidade de desempenhar a função de Monitor de Biologia, vital a minha formação profissional. Minha eterna gratidão, em especial à figura do Diretor Arão Gerscovich.

Aos professores e coordenadores do Curso de Medicina Veterinária da

Universidade Federal Fluminense, por me proporcionarem uma graduação, com base sólida, na Medicina Veterinária.

À equipe de Jiu-Jitsu Nova-União-Fortaleza, na figura do professor Daniel Beleza, que me recebeu respeitosamente nos treinos. Proporcionando, um ambiente amistoso para descarregar as tensões profissionais e pessoais.

Ao criador João Batista, por disponibilizar os bodes utilizados no experimento.

Aos quatro bodes, dois da raça Saanen chamados de 1 e 2 e, dois da raça Boer conhecidos como 4 e 5, pela participação e empenho durante todo o experimento. E pelo rápido e eficiente condicionamento à coleta de sêmen em vagina artificial.

Aos animais, pelas lições de vida e morte, ofereço o resultado do meu estudo e trabalho.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela bolsa de pesquisa que me proporcionou capacidade e tranqüilidade para realização e dedicação exclusivas à pesquisa científica.

A todos aqueles que influenciaram direta ou indiretamente a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

O trabalho teve como objetivos: avaliar “in vitro” o sêmen caprino congelado nos meios diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS (hidroxi-metil amino metano); analisar o efeito de soluções para re-diluição seminal pós-descongelação por meio de parâmetros cinéticos mensurados pelo sistema Sperm Class Analyser[®] e; comparar a eficiência do corante azul de bromofenol (AB) com o corante clássico de eosina-nigrosina (EN) na avaliação morfológica do sêmen caprino fresco e descongelado submetidos ao teste de termo-resistência. Foram utilizados quatro bodes. Os diluentes empregados foram: ACP-101 (+ 2,5% gema ovo + 7% glicerol) e TRIS (+ 20% gema ovo + 6,8% glicerol). Os ejaculados foram coletados por vagina artificial, avaliados quanto a: volume, concentração, motilidade massal, porcentagem de espermatozóides móveis, motilidade individual progressiva, porcentagem de vivos e mortos e, alterações morfológicas. Em seguida, divididos em duas alíquotas, diluídas nos tratamentos experimentais ACP-101 e TRIS. As amostras foram refrigeradas até 4°C, envasadas em palhetas, congeladas em vapores de nitrogênio, armazenadas em botijão criogênico (-196°C) e descongeladas após 30 dias. As avaliações de motilidade espermática auxiliada por computador foram realizadas aos 5, 60 e 120 minutos pós-descongelação. Para re-diluição pós-descongelação foram utilizados diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS sem gema e sem glicerol), soluções de Ringer Lactato (RL) e de NaCl a 0,9% (SF). Três palhetas de cada tratamento por ejaculado avaliadas e re-diluídas, com uma das três soluções de re-diluição. Os parâmetros de motilidade espermática auxiliada por computador analisados foram: motilidades total (MT) (%) e progressiva (MP) (%), velocidades média do trajeto do espermatozóide (VAP) ($\mu\text{m/s}$) e linear (VSL) ($\mu\text{m/s}$), e população de espermatozóides rápidos (ER) (%). A morfologia espermática foi avaliada, aos 5 e 120 minutos pós-descongelação, por meio de esfregaços corados por EN e AB. Os parâmetros morfológicos avaliados foram: espermatozóides normais (N), alterações de cabeça (AC), de peça intermediária (API), e de flagelo (AF), gotas citoplasmáticas proximal (GCP), e distal (GCD), e cabeça destacada (CD). Os dados foram submetidos à ANOVA e aos teste de Duncan e Tukey ($P < 0,05$). Independentemente da variável cinética, o tratamento ACP x RL apresentou-se significativamente inferior durante o teste de termo-resistência. O diluente à base de TRIS apresentou resultados cinéticos significativamente superiores ao ACP-101, aos 60 e 120 minutos. Os espermatozóides diluídos e congelados no TRIS não sofreram influência das soluções de re-diluição pós-descongelação. Não existiu diferença significativa na observação de N entre tratamentos após 5 minutos do teste de termo-resistência. Após 120 minutos a quantificação de N foi influenciada significativamente pelo diluente, tendo o TRIS apresentado resultados superiores. O período de incubação de 120 minutos a 37°C promoveu o aumento das AC. Os parâmetros cinéticos, após 5 minutos de incubação a 37°C, dos espermatozóides diluídos e congelados em meio à base de ACP-101 demonstram sua potencialidade na criopreservação seminal de bodes. O meio diluente à base de TRIS promoveu uma maior proteção quanto às crioinjúrias em espermatozóides caprinos congelados. O corante azul de bromofenol demonstrou ser eficiente na avaliação do sêmen caprino fresco e pós-descongelação.

Palavras-chave: caprinos; espermatozóides; água de coco em pó; TRIS; eosina-nigrosina; azul de bromofenol.

ABSTRACT

The aim of the work was: to evaluate “in vitro” the goat semen frozen in diluents media based on powder coconut water (PCW-101) and TRIS (hydroxymethyl amino methane); analyze the effect of solution for redilution of semen samples post-thawing through kinetic parameters measured by Sperm Class Analyser[®] and; compare the bromophenol blue stain efficiency with the classic stain eosin-nigrosin on the morphologic evaluation of fresh and post-thawing goat semen submitted to thermo resistance test. Four goats were utilized. The employed diluents were: PCW-101 (+ 2,5% egg yolk + 7% glycerol) and TRIS (+ 20% egg yolk + 6,8% glycerol). The ejaculateds were collected using artificial vagina, assessed for: volume, concentration, mass motility, percentage of motile spermatozoa, and progressive individual motility. Right away, each ejaculate was divided into two aliquots and diluted into the experimental treatments PCW-101 and TRIS. The samples were refrigerated to 4°C, glycerolated, loaded into straws, frozen into nitrogen vapors (-100°C), stored into cryogenic tank (-196°C) and thawed after 30 days. The spermatic motility evaluations assisted by computer were placed into 5, 60 and 120 minutes post-thawing. For redilution post-thawing were utilized basis diluent (BD: PCW-101 or TRIS without yolk and without glycerol), Ringer Lactate solutions (RL) and 0,9% NaCl (PS). Three straws from each treatment were thawed, being each an evaluated and rediluted, with one of the three solutions for redilutions, respectively. The motion parameters assisted by computer assessed were: total motility (TM) (%), progressive motility (PM) (%), average path velocity (VAP) ($\mu\text{m/s}$), straight linear velocity (VSL) ($\mu\text{m/s}$), and population of rapid spermatozoa (RS) (%). Spermatic morphology was evaluated at 5 and 120 minutes post-thaw, through semen smears stained by eosin-nigrosin (EN) and bromophenol blue (BB). The morphologic parameters evaluated were: normal spermatozoa (N), head alteration (HA), intermediary piece alteration (IPA), tail alteration (TA), proximal citoplasmic drop (PCD), distal citoplasmic drop (DCD), and detached head (DH). The data were analyzed using ANOVA and Duncan's and Tukey tests with 5% of probability (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Independently of the kinetic variable studied, the treatment PCW x RL showed significantly inferior to the other during the thermo resistance test. The media based on TRIS showed kinetic results significantly superior to PCW-101, to the 60 and 120 min. The spermatozoa diluted and frozen on TRIS didn't suffer the redilution solution influence post-thaw. There wasn't significant difference in the observation of N between media staining and their interactions after 5 minutes of thermo resistance test. After 120, the N was significantly influenced by media, where the TRIS presented better results. The incubation period of 120 minutes at 37°C affect the spermatic morphology, increasing the HA percentages into all treatments. Kinetic parameters, after five minutes incubated at 37°C, of goat spermatozoa diluted and frozen on media based on PCW-101 showed the potentiality of this media on buck seminal cryopreservation. The media based on TRIS promoted better protection from the cryoinjuries on frozen goat spermatozoa. Bromophenol blue staining was efficient on the fresh and post-thaw goat semen evaluation.

Keywords: goat; spermatozoa; powder coconut water; TRIS; eosin-nigrosin; bromophenol blue.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiv
LISTA DE QUADROS E FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Preservação do sêmen de bodes.....	03
2.1.1. Qualidade seminal.....	03
2.1.2. Diluição seminal.....	04
2.1.3. Congelação do sêmen caprino.....	04
2.1.3.1. Diluentes de congelação.....	07
2.1.3.2. Diluentes à base de água de coco.....	08
2.1.4. Danos produzidos ao espermatozóide pela criopreservação.....	10
2.2. Análise seminal.....	11
2.2.1. Sistema de análise seminal auxiliado por computador.....	11
2.2.2. Análise da morfologia espermática e integridade de membrana por colorações vitais.....	14
3. JUSTIFICATIVA.....	17
4. HIPÓTESES.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. Objetivo Geral.....	19
5.2. Objetivos Específicos.....	19
CAPÍTULO 1. Efeito de meios de re-diluição pós-descongelação sobre a cinética de espermatozóides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS.....	20
CAPÍTULO 2. Avaliação morfológica de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol.....	41
6. CONCLUSÕES.....	61
7. PERSPECTIVAS.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AB	corante azul de bromofenol
AC	alteração de cabeça
ACP	água de coco em pó
ACP- 101	diluyente à base de água de coco em pó formulado para a espécie caprina
AF	alteração de flagelo
ALH	amplitude of lateral head displacement (amplitude do deslocamento lateral da cabeça)
ANOVA	análise de variância
API	alteração de peça intermediária
BCF	beat cross frequency (frequência de batimento cruzado)
BU-III	fração protéica III da glândula bulbouretral
CASA	computer –aided sperm analysis (análise de sêmen auxiliada por computador)
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
DB	diluyente base
DMSO	dimetil-sulfóxido
EN	corante eosina-nigrosina
ER	porcentagem de espermatozóides rápidos analisados computador
EYCE	egg yolk coagulating enzyme (enzima coaguladora da gema de ovo)
GCP	gota citoplasmática proximal
GCD	gota citoplasmática distal
IAA	ácido 3-indol-acético
LIN	linearity (linearidade)
MIP	motilidade individual progressiva
MM	motilidade massal
MP	porcentagem de motilidade espermática progressiva analisada computador
MT	porcentagem de motilidade espermática total analisada computador
N ₂ L	nitrogênio líquido
OSC	wobble (índice de oscilação)

PB	proteína bruta
PBS	solução fosfato salina
PEM	porcentagem de espermatozóides móveis
RL	Ringer Lactato
SCA	Sperm Class Analyser
SF	solução fisiológica a 0,9% de NaCl
STR	straightness (retilinearidade)
TALP	Tyrode´s-albumina-lactato-piruvato
TRIS	tris-hidroximetil-aminometano
TTR	teste de termo-resistência
VCL	curvilinear velocity (velocidade curvilinear)
VAP	average path velocity (velocidade média da trajetória)
VSL	straight line velocity (velocidade linear)
v/v	volume a volume

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 1. Parâmetros de motilidade espermática obtidos por meio de sistemas de CASA.....	12
Figura 1. Velocidades obtidas por sistemas de CASA (Boyer <i>et al.</i> , 1989; Verstengen <i>et al.</i> , 2002; Mortimer, 2000).....	13

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Parâmetros (média \pm dp) do sêmen fresco de quatro bodes.....	32
Tabela 2. Análise auxiliada por computador da motilidade de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco (ACP-101) e TRIS, e re-diluídos no próprio diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS; sem gema; sem glicerol), ou solução de Ringer Lactato (RL) ou solução de NaCl a 0,9% (SF), após 5 minutos do teste de termo-resistência.....	33
Tabela 3. Análise auxiliada por computador da motilidade de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco (ACP-101) e TRIS, e re-diluídos no próprio diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS; sem gema; sem glicerol), ou solução de Ringer Lactato (RL) ou solução de NaCl a 0,9% (SF), após 60 minutos do teste de termo-resistência.....	34
Tabela 4. Análise auxiliada por computador da motilidade de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco (ACP-101) e TRIS, e re-diluídos no próprio diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS; sem gema; sem glicerol), ou solução de Ringer Lactato (RL) ou solução de NaCl a 0,9% (SF), após 120 minutos do teste de termo-resistência.....	35

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros (média \pm dp) do sêmen fresco de quatro bodes.....	53
Tabela 2. Integridade de membrana de espermatozóides caprinos frescos, corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), logo após a coleta por vagina artificial.....	53
Tabela 3. Avaliação morfológica de espermatozóides caprinos frescos, corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), logo após a coleta por vagina artificial.....	54

Tabela 4. Avaliação morfológica de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco (ACP-101) e TRIS, por meio de esfregaços corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), após 5 minutos do teste de termo-esistência.....	55
Tabela 5. Avaliação morfológica de espermatozóides caprinos diluídos e congelado em meios à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, por meio de esfregaços corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), após 120 minutos do teste de termo-resistência.....	56

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se produzido um aumento notável do interesse pelos caprinos. Esse fato parece derivar, tanto de sua grande capacidade de adaptação aos modernos sistemas de exploração, como de sua facilidade para o aproveitamento de áreas marginais para sua alimentação, áreas que não são utilizadas por outras espécies.

Os índices reprodutivos influenciam o nível produtivo de um rebanho. Um aumento da fertilidade e da prolificidade terá como conseqüência um incremento imediato na produção de leite, por meio de um maior número de fêmeas em lactação, e de carne e pele, devido a um maior número de crias nascidas. A inseminação artificial acelera o incremento na eficiência reprodutiva e produtividade de um rebanho, por meio da utilização de reprodutores selecionados.

Dentre as técnicas aplicadas em programas de inseminação artificial, há o uso do sêmen diluído criopreservado. Esta técnica tem como vantagem por sobre as demais conservar a capacidade fecundante do sêmen por longos períodos de armazenamento.

Nunes (1986) demonstrou a viabilidade da água de coco como diluente de refrigeração e congelação do sêmen caprino, o que levou à elaboração de um meio de conservação, padronizado e estabilizado, à base de água de coco em pó (ACP). Estudos sobre a estabilização da água de coco em pó (ACP) e de suas características físico-químicas são importantes por contribuir para o conhecimento das substâncias e fatores inerentes à água de coco que protegem os espermatozóides durante a criopreservação e disponibilizar água de coco em centros de pesquisa que não disponham da matéria-prima (coco).

Entretanto, até o momento atual, não se tem o domínio de protocolos que utilizam a água de coco como diluente para criopreservação seminal. O desenvolvimento de um método de congelação de sêmen em caprinos é imprescindível não só para levar a cabo um bom programa de seleção e melhora das raças caprinas como também para fazer frente à atual demanda de sêmen e reprodutores destas raças de alta produção.

A avaliação seminal consiste, normalmente, em uma avaliação subjetiva da motilidade espermática, associada à análise da morfologia dos espermatozóides.

Contudo, existe uma variação entre avaliadores de sêmen, bem como a limitação do ser humano em quantificar as diferentes sub-populações espermáticas nas amostras, quanto à qualidade da motilidade. Recentemente, com o advento dos sistemas de análise seminal auxiliada por computador (CASA), obtém-se informação acurada da motilidade de cada espermatozóide, bem como resumos estatísticos das sub-populações espermáticas.

Os sistemas de CASA, para uma correta análise, precisam de concentrações espermáticas entre $20-50 \times 10^6$ /ml. A dose inseminante em caprinos varia entre 100 e 200×10^6 espermatozóides em palhetas de 0,25 ou 0,50 ml, em concentrações de 200 a 400×10^6 sptz/ml. Sendo assim, para sua avaliação, deve ocorrer uma re-diluição da amostra. Porém, o efeito das soluções de re-diluição sobre os parâmetros da cinética espermática têm sido pouco estudado.

A análise morfológica de espermatozóides caprinos é classicamente realizada por meio de esfregaços corados pela eosina-nigrosina. Porém, recentemente, demonstrou-se a eficiência do corante vital azul de bromofenol na avaliação do sêmen ovino fresco (Medeiros, 2004). Necessário se faz a validação dessa técnica para a análise morfológica do sêmen caprino congelado, buscando-se sempre uma relação custo-benefício favorável na adoção de soluções para a coloração espermática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Preservação do sêmen de bodes

2.1.1. Qualidade seminal

A avaliação da qualidade seminal é complementar ao exame clínico para estimar o potencial de um macho, como um reprodutor e normalmente julga-se o volume, aspecto, concentração, motilidade e morfologia espermática (Rodriguez-Martinez, 2005).

Os espermatozóides podem apresentar três principais movimentos identificáveis subjetivamente: progressivo, circular e oscilante (Evans e Maxwell, 1990).

A motilidade espermática em pequenos ruminantes é, classicamente, avaliada por meio da motilidade massal, porcentagem de células móveis e motilidade individual progressiva (ou vigor) (Evans e Maxwell, 1990; Chemineau *et al.*, 1991; CBRA, 1998).

Como a concentração espermática é elevada, é visível um movimento de massa dos espermatozóides, observando uma gota de sêmen puro sob microscopia, atribuindo a intensidade das ondas uma nota de 0 a 5. Quanto a avaliação da porcentagem de espermatozóides móveis e motilidade individual progressiva, que também é qualificada com notas de 0 a 5, o sêmen deve ser diluído, para visualização individualizada dos espermatozóides (Evans e Maxwell, 1990; Chemineau *et al.*, 1991; CBRA, 1998).

No rebanho caprino as correlações entre os testes *in vitro* e a fertilidade não são altas, entretanto a motilidade individual progressiva dos espermatozóides após duas horas de incubação pós-descongelamento (teste de termo-resistência) tem sido relacionada com a fertilidade (Chemineau *et al.*, 1991).

2.1.2. Diluição seminal

Os diluentes permitem o aumento do volume total do ejaculado, facilitando sua divisão em doses inseminantes e, proporcionando um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozóides *in vitro* (Derivaux, 1980). Diferem em sua composição dependendo da espécie animal de que proceda o sêmen e da tecnologia seminal empregada (Hopkins e Evans, 1991).

Hafez e Hafez (2004) sugerem que um diluente deve: proporcionar nutrientes como fonte de energia; proteger os espermatozóides do efeito deletério do frio; proporcionar um meio tampão; manter a pressão osmótica adequada; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do ejaculado; proteger as células espermáticas durante a congelação.

A dose inseminante ótima do sêmen de bodes para inseminação cervical é de 200×10^6 espermatozóides, em um volume de 0,25 a 0,50 ml (Corteel e Lebouf, 1990). Segundo Evans e Maxwell (1990) um volume adequado para a inseminação cervical e intra-uterina seria de 0,50 e 0,20 ml, respectivamente.

Alguns diluentes mantêm a viabilidade do sêmen à temperatura ambiente, enquanto que outros são utilizados a 4 e 5°C, permitindo um controle do crescimento bacteriano e redução da taxa metabólica das células espermáticas (Hopkins e Evans, 1991).

2.1.3. Congelação do sêmen caprino

Os espermatozóides de caprinos foram congelados pela primeira vez (-79°C) por Smith e Polge (1950). Segundo Hunter (1982), a viabilidade de espermatozóides congelados relaciona-se a fatores como: o diluente e a concentração de células; o agente crioprotetor adequado e sua concentração no meio, o tempo e a temperatura de equilíbrio, a natureza da curva de resfriamento, a natureza da curva de descongelação, a utilização de um meio de descongelação específico; o modo de eliminar o agente crioprotetor (diluição ou diálise).

Segundo Hopkins e Evans (1991), a sensibilidade dos espermatozóides às mudanças de temperatura se deve a ação protetora do plasma seminal e à integridade da membrana espermática. Esta última relaciona tanto com sua

composição lípido-protéica como de colesterol e fosfolipídios (Darin-Bennett e White, 1977).

A maioria dos diluentes apresenta a gema de ovo como componente básico, já que a fosfatidilcolina (lecitina) e lipoproteínas da gema e a caseína do leite protegem os espermatozoides durante o resfriamento, contra o choque térmico (Mies Filho *et al.*, 1982; Das e Rajkonwar, 1995).

A congelação do sêmen em caprinos apresenta dificuldades comuns à congelação do sêmen de outras espécies como: formação de cristais de gelo intra e extracelulares e aumento da concentração de solutos (Mateos-Rex e Aguillar, 1996).

Além disso, particularmente, as glândulas bulbouretrais do bode, produzem uma fosfolipase (EYCE) que hidrolisa a lecitina da gema de ovo, formando ácidos graxos e lisolecitina, esta última atua sobre a membrana espermática danificando-a (Roy, 1957). Nunes *et al.* (1982), descobriram a existência de uma fração protéica do plasma (BU-III), procedente das glândulas bulbouretrais, que interage com o leite, produzindo inibição da motilidade espermática e induzindo a reação acrossômica. É provável que a EYCE e a BU-III sejam a mesma molécula (Lebouf *et al.*, 2000).

Esta reação adversa do plasma seminal caprino com a gema de ovo se produz em concentrações tão baixas como 2,5% (Roy, 1957). Portanto, se recomenda a eliminação do plasma seminal quando os espermatozoides caprinos devem ser conservados a baixas temperaturas em diluentes contendo gema de ovo (Corteel, 1992).

Roca *et al.* (1997) observaram que a eliminação do plasma seminal, em caprinos, imediatamente depois da coleta, aumenta a porcentagem de células vivas e sua motilidade durante sua conservação a 5°C em diluentes contendo gema de ovo ou leite.

Contudo, Cabrera *et al.* (2005), determinando o efeito da remoção do plasma seminal e gema de ovo sobre a congelabilidade do sêmen caprino, relataram que a concentração da gema no diluidor foi mais relevante que o efeito de lavagem, e que não houve diferenças significativas no sêmen descongelado com 2 dias, 2 ou 6 meses de armazenamento em nitrogênio líquido.

Já Viana *et al.* (2006), comparando o sêmen caprino lavado e não lavado, diluído em TRIS-gema e leite desnatado, resfriado a 4°C, não observaram diferença de motilidade espermática e patologias de acrossoma, após o resfriamento.

Chauhan e Anand (1990) observaram que os lipídios da gema de ovo acrescentados ao sêmen caprino diluído, não foram hidrolisados a ácidos graxos e lisolecitinas nem antes nem depois da congelação.

Roca *et al.* (1997) demonstraram que os espermatozóides não-lavados de caprinos da raça Murciano-Granadina podem ser conservados a 5°C após sua diluição em TRIS com 2% de gema de ovo.

A utilização de diluentes pobres em fosfolipídios na criopreservação do esperma caprino permite suprimir os processos de lavagem (Machado, 1991). Entretanto Cabrera *et al.* (2005), ressaltaram que interação negativa de diluentes contendo gema de ovo sobre o sêmen de bodes é mais relacionada a caprinos criados em áreas de clima temperado, durante a estação não reprodutiva.

Bodes criados em latitudes menores do que 30°C normalmente não apresentam diferenças na atividade reprodutiva, como conseqüência da influência da estação do ano. Nestas áreas o fotoperíodo tem pequenas flutuações anuais, sendo assim, as variações reprodutivas são mais influenciadas pela temperatura, umidade e disponibilidade de alimentos (Pérez e Mateos, 1996).

Quando o sêmen é congelado sem a eliminação do plasma seminal (não-lavado), os ejaculados podem ser diluídos por meio da adição de um meio contendo glicerol a 30°C (uma fase), refrigerado em 1-1,5 horas até alcançar 4-5°C e congelados sem tempo de equilíbrio (Ritar *et al.*, 1990).

Alternativamente, a diluição do sêmen não-lavado pode ser feita em duas fases, a primeira depois da coleta (30°C) com um diluente que não contenha glicerol e a segunda depois da refrigeração (4-5°C) com o diluente contendo glicerol, seguido de um tempo de equilíbrio de 1,5 horas antes da congelação. Ritar e Salamon (1982) não observaram diferença na viabilidade espermática pós congelação-descongelação ao comparar ambos os métodos.

Observam-se diferenças com relação à “congelabilidade” e fertilidade do sêmen entre indivíduos e entre ejaculados de um mesmo indivíduo (Watson, 1981). As comparações entre os métodos e protocolos de congelação-descongelação do sêmen são difíceis devido aos diferentes parâmetros envolvidos e à falta de uniformidade nas metodologias (Leboeuf *et al.*, 2000), sendo utilizados como métodos de congelamento os vapores de nitrogênio ou congeladores programáveis (Choe *et al.*, 2000; Purdy, 2005).

2.1.3.1. Diluentes de congelação

A composição do diluente é um dos fatores que afeta à proporção de espermatozóides vivos após a congelação-descongelação (Watson, 1995). Uma das grandes metas da biotecnologia da reprodução de caprinos é a de encontrar um bom diluente para a criopreservação do sêmen.

Os diluentes para congelação devem possuir: uma substância orgânica que atue como crioprotetor externo e que proteja as células contra o choque térmico que se produz ao resfriar o sêmen desde os 20°C aos 5°C: gema de ovo ou leite desnatado; uma fonte de energia: glicose ou frutose; um componente tampão: citrato de sódio ou tris-hidroximetil-aminometano (TRIS); um crioprotetor interno que proteja aos espermatozóides durante a congelação: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol; açúcares como a lactose e rafinose, um antibiótico para prevenir o crescimento bacteriano: penicilina, estreptomicina ou gentamicina. Souza *et al.* (2006) avaliando microbiologicamente o sêmen congelado caprino concluíram que o antibiótico gentamicina pode ser adicionado aos diluentes de criopreservação.

Aboagla e Terada (2004) sugeriram que a adição de gema de ovo ao diluente seminal é importante não só para a etapa de resfriamento bem como para a etapa de congelação, durante o protocolo de criopreservação. Kundu *et al.* (2001) demonstraram o efeito crioprotetor de aminoácido sobre espermatozóides caprinos da cauda do epidídimo.

Com estes componentes têm sido desenvolvidos distintos tipos de diluentes para a congelação do sêmen caprino, entre os que podemos destacar: glicose, leite desnatado e glicerol (Corteel, 1975); TRIS, glicose, gema de ovo e glicerol (Ritar e Salamon, 1982); TRIS, frutose, gema de ovo e glicerol (Deka e Rao, 1987); glicose, gema de ovo, leite e glicerol (Chauhan e Anand, 1990); TRIS, frutose, lactose, ácido cítrico, gema de ovo e glicerol (Singh *et al.*, 1995).

O glicerol é um crioprotetor interno ou penetrante (Purdy, 2005) que reduz os danos da membrana espermática e formação de gelo intracelular, mas as concentrações podem interferir na capacidade de fecundação dos espermatozóides (Curry, 2000; Purdy, 2005). O glicerol é o crioprotetor mais utilizado para congelação do espermatozóide caprino (Purdy, 2005). Fraser (1962), avaliando a congelação do

sêmen caprino no leite desnatado em diferentes concentrações de glicerol, obteve os melhores resultados em relação à motilidade com níveis de glicerol entre 6 e 9%. As concentrações de glicerol utilizadas por diferentes pesquisadores variam de 3% a 9%, com o ótimo de 4-7% no sêmen diluído (Lebouf *et al.*, 2000).

Podem ser utilizados dois tipos de diluentes, um de refrigeração e outro de congelação. O diluente de refrigeração não contém glicerol já que este, à temperatura ambiente, é muito tóxico para os espermatozóides. Segundo Corteel (1975), o leite desnatado com 14% de glicerol se adiciona a 4°C em três fases, com intervalos de 10 minutos, resultando em uma concentração final de 7% de glicerol e uma concentração espermática de 400 a 500x10⁶ espermatozóides/ml. Já, no método de Ritar e Salamon (1982) o diluente à base de TRIS com glicerol é adicionado ao sêmen não-lavado em uma fase, a 30°C, e as concentrações finais de glicerol e gema de ovo são 4% e 2%, respectivamente. Vale ressaltar que Tuli e Holtz, (1994) não constataram diferenças da adição do glicerol a 5°C sobre a adição a 30°C.

Segundo Purdy (2005) o tipo de descongelação é determinado pelo protocolo usado no congelação do sêmen. Mas a descongelação a 37°C tem se demonstrado a mais eficiente, para maioria dos métodos (Corteel, 1975; Salamon e Ritar, 1982; Deka e Rao, 1987).

2.1.3.2. Diluentes à base de água de coco

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (Nunes e Combarnous, 1995), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporcionando os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade de gametas masculinos e femininos criopreservados (Blume e Marques Jr., 1994).

A água de coco tem sido utilizada em biotecnologias da reprodução animal, obtendo-se bons resultados com a utilização da água de coco na preservação do sêmen de animais domésticos como caprinos (Salles, 1989), ovinos (Araújo, 1990), suínos (Toniolli e Mesquita, 1990) e caninos (Montezuma Jr. *et al.*, 1994; Cardoso *et al.*, 2003).

Nunes (1986, 1987), avaliando o sêmen caprino após duas horas de incubação a 37°C, observou que tanto a motilidade individual progressiva (MIP) como a porcentagem de espermatozóides móveis (PEM) eram superiores no sêmen diluído em uma solução à base de água de coco, comparado ao diluído em leite desnatado. A motilidade individual progressiva dos espermatozóides diluídos em água de coco quando comparados aos diluídos em leite glicosado foi superior ao final de 2 horas de incubação (Nunes e Salgueiro, 1999).

Resultados similares foram obtidos ao utilizar ambos os diluentes na refrigeração de sêmen a 4°C e em seu uso para inseminação artificial em cabras submetidas à sincronização do estro (Nunes, 1986). Com o uso da inseminação artificial com sêmen caprino diluído em água de coco e refrigerado a 4°C se obtiveram taxas de parição superiores a 60% (Nunes, 1986).

Freitas (1988) observou 55,6% de fêmeas contra 44,4% de machos nascidos de partos de cabras inseminadas com sêmen diluído em água de coco. Salles (1989) inseminou 78 cabras com sêmen resfriado a 4°C e diluído em água de coco na forma *in natura*, estabilizada e de gel, observando as respectivas taxas de partições: 63,15%, 87,50% e 92,59%. Com relação à proporção sexual, foram obtidos valores de 83,33%, 76,00% e 67,89% de fêmeas nascidas, segundo a forma da água de coco utilizada: *in natura*, estabilizada e de gel, respectivamente.

Tratando de determinar a fração da água de coco que atua sobre os espermatozóides, Nunes *et al.* (1994) isolaram uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol-acético (IAA), que ativa o metabolismo dos espermatozóides. A presença do IAA pode variar com o estágio de maturação e a espécie do fruto e influir nos resultados *in vitro* e *in vivo* em sêmen diluído em água de coco (Nunes e Salgueiro, 1999).

A introdução do IAA na composição dos diluentes convencionais do sêmen de diferentes espécies conferiu aos espermatozóides um aumento de motilidade, maior taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais prolongados (Nunes *et al.*, 1994).

Araújo e Nunes (1991) avaliando o sêmen caprino diluído e congelado em água de coco *in natura* com gema de ovo (10%) e sem gema, verificaram após a descongelação que a adição da gema de ovo conferiu uma maior sobrevivência espermática *in vitro*. Salgueiro *et al.* (2003) avaliando o sêmen caprino diluído e congelado com água de coco em pó (ACP-101) com 2,5 % de gema de ovo e 7% de

glicerol obteve em média, após 5 minutos de descongelação, 33% de espermatozóides móveis e motilidade individual progressiva de 2,48.

Salgueiro (2003) avaliou a fertilidade do sêmen caprino diluído e congelado, em diluentes a base de água de coco *in natura* e TRIS, após inseminação artificial via cervical de 129 cabras, observando maior fertilidade no sêmen congelado em água de coco (47%), o qual também promoveu maior número de nascimento de fêmeas.

2.1.4. Danos produzidos ao espermatozóide pela criopreservação

Após o processo de preservação, as células espermáticas devem apresentar boa motilidade a fim de alcançar o local da fecundação e manter a integridade das membranas espermáticas para poder levar a cabo a penetração do ovócito (Royere, 1996), já que qualquer falha inerente à fisiologia espermática poderia prejudicar sua capacidade de fertilização do oócito, como também de suportar o desenvolvimento embrionário (Holt e Look, 2004).

O resfriamento deve ser suficientemente lento para minimizar a formação de cristais de gelo intracelular e o suficientemente rápido para tornar mínimo o dano do “efeito solução” (Watson, 1995).

Silva e Gadella (2006) destacam que todo processamento seminal, como coleta, diluição, centrifugação, resfriamento, podem produzir danos as membrana, organelas e ao material genético espermático.

Durante os processos de congelação-descongelação os espermatozóides são submetidos a condições desfavoráveis como: a desidratação, as mudanças da fase de transição dos fosfolipídios da membrana, o efeito solução e a formação de gelo intracelular (Parks e Graham, 1992).

A consequência imediata destes processos é a ruptura da membrana plasmática (Watson, 1995) devido aos estresses térmico, mecânico, químico e osmótico exercidos sobre a célula durante a congelação (Parks e Graham, 1992). O acrossoma também pode sofrer mudanças estruturais e degenerativas, como ruptura da membrana acrossomal (Hafez e Hafez, 2004).

As injúrias causadas pela criopreservação são prejudiciais ao transporte e sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino (Salamon e

Maxwell, 1995). Segundo Bailey *et al.* (2000), a capacitação espermática induzida pela congelação poderia produzir uma população de espermatozóides após a descongelação com viabilidade curta e ineficiente.

Tuli e Holtz (1995) calcularam que o percentual de redução de motilidade progressiva subjetiva, do sêmen fresco para o sêmen descongelado de bodes, foi em torno de 46%. Azêredo *et al.* (2001) constataram diminuição da motilidade após a descongelação do sêmen caprino lavado e, que o processo de criopreservação teve um efeito deletério sobre o vigor da motilidade espermática.

Bittencourt *et al.* (2004) avaliaram a eficiência do glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino e concluíram que o glicerol a 7% promoveu taxas de motilidade superiores, porém, mais alterações morfológicas.

Bittencourt *et al.* (2006) demonstraram a influência deletéria do tempo de equilíbrio, à temperatura de 5°C, sobre a morfologia espermática após o processo de criopreservação, quanto aos defeitos maiores e alterações acrossomais.

2.2. Análise seminal

2.2.1. Sistema de análise seminal auxiliado por computador

Classicamente, o julgamento da qualidade seminal tem sido baseado em uma avaliação subjetiva de parâmetros como, motilidades massal e individual, sendo estas consideradas uma expressão da viabilidade e integridade estrutural dos espermatozóides (Verstegen *et al.*, 2002). Mack *et al.* (1988) ressaltaram que a necessidade de uma metodologia objetiva, motivou a elaboração e desenvolvimento de instrumentos automatizados capazes de analisar as trajetórias dos espermatozóides.

Amann e Katz (2004) definiram a análise de sêmen assistida por computador (CASA), como um sistema automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozóides, fornecendo informação acurada, precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozóide e também resumos estatísticos das sub-populações espermáticas (ex: rápidos, médios e lentos).

Os parâmetros comumente obtidos por meio de analisadores de sêmen computadorizados são: velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória

(VAP), velocidade linear progressiva (VSL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (OSC) (vide Quadro 1; Figura 1).

Quadro 1. Parâmetros de motilidade espermática obtidos por meio de sistemas de CASA (Verstegen *et al.*, 2002).

Parâmetro	Sigla	Unidade	Descrição
Velocidade curvilinear	VCL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade da trajetória real do espermatozóide
Velocidade média da trajetória	VAP	$\mu\text{m/s}$	Velocidade da trajetória média do espermatozóide
Velocidade linear	VSL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e último ponto da trajetória do espermatozóide
Linearidade	LIN	%	Relação percentual entre VSL e VCL
Retilinearidade	STR	%	Relação percentual entre VSL e VAP
Index de oscilação	OSC	%	Relação percentual entre VAP e VCL
Amplitude do deslocamento lateral da cabeça	ALH	μm	Deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real em relação à trajetória média ou linear
Frequência do batimento cruzado	BCF	Hz	Frequência que a cabeça do espermatozóide atravessa a trajetória média.

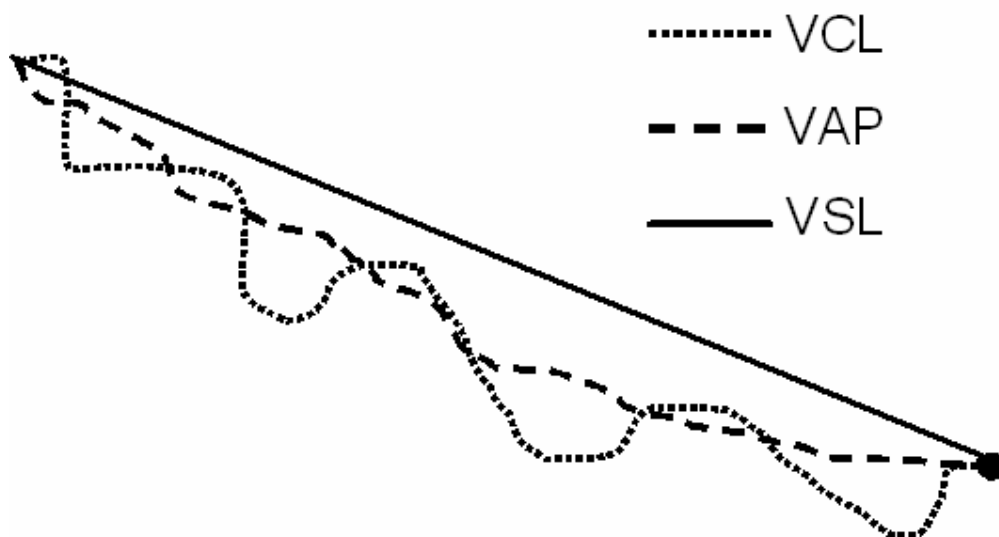


Figura 1. Velocidades obtidas por sistemas de CASA (Boyer *et al.*, 1989; Versteegen *et al.*, 2002; Mortimer, 2000).

Cox *et al.* (2006), caracterizaram a trajetória do espermatozóide caprino como relativamente rápida (VCL, VAP e VSL > 100 μ m/s) e linear (LIN > 50%) e ALH = 4,8 μ m, e observaram uma relação entre os parâmetros de velocidade com a eficiência na migração do muco cervical caprino. Cavalcante (2003), avaliando o sêmen fresco e descongelado de bodes da raça Boer, por meio do CASA, constataram, em relação as motilidades total e progressiva, valores de 93% e 64% no fresco e, 51% e 21% no descongelado, respectivamente, entretanto, não foram observadas diferenças após a criopreservação em relação aos dados de ALH, BCF, STR e LIN.

Tardif *et al.* (1997) observaram um aumento de deslocamento lateral da cabeça após o resfriamento do sêmen bovino.

Aboagla e Terada (2003) criopreservaram sêmen caprino lavado no diluente TRIS-glicose-ácido cítrico com 20% de gema e 8% de glicerol e, observaram à descongelação, re-diluindo o sêmen em solução de TRIS, na avaliação da motilidade espermática auxiliada por computador, 62% de motilidade total, 49% de motilidade progressiva e VAP de 81,0 μ m/s. Bag *et al.* (2003), avaliaram o sêmen descongelado de carneiros, por meio de análise computadorizada, re-diluído em solução de citrato de sódio 2,9%, entretanto, Purdy (1996), utilizou solução salina-TRIS.

Farrel *et al.* (1998), avaliaram o sêmen bovino fresco com diluído em meio TALP (Tyrode's-albumina-lactato-piruvato). Tardif *et al.* (1997) comparando a motilidade espermática, por meio de um sistema CASA, de sêmen bovino fresco diluído nos meios TALP, Cornell University e TRIS-gema-glicíerol, obtiveram resultados inferiores com o meio a base de TRIS.

Dentre os fatores que afetam a motilidade avaliada por sistemas de CASA, pode-se citar: temperatura, processamento seminal (diluição, resfriamento, congelamento-descongelamento), viscosidade do meio e concentração espermática. (Verstegen *et al.*, 2002; Fujimura e Okuno, 2006). Esta última deve permanecer entre 20 e 50.10⁶ espermatozóides/ml (Verstegen *et al.*, 2002).

O desenvolvimento inicial dos sistemas CASA foi baseado na hipótese que a motilidade espermática era o principal critério seminal. Entretanto, com o advento da fertilização *in vitro*, a qualidade do movimento dos espermatozóides tem sido relegada em alguns casos (Amann e Katz, 2004). Krause e Viethen (1999), revisando sobre a avaliação seminal auxiliada por computador destacam que os esforços não devem ser apenas direcionadas no desenvolvimento de sistema de CASA superiores, mas também, devem ser relacionados a qualidade de treinamento dos avaliadores de sêmen.

2.2.2. Análise da morfologia espermática e integridade de membrana por colorações vitais

A morfologia espermática pode ser avaliada por meio de preparação úmida e esfregaços corados (Bearden e Fuquay, 1992). Derivaux (1980) relata que as anormalidades espermáticas podem afetar, isolada ou simultaneamente, as diferentes regiões da cabeça, peça intermediária e peça principal.

As alterações de cabeça são relacionadas quanto à forma, dimensão, duplicação e acrossomas, as de peça intermediária quanto a sua amplitude, dimensão, duplicação, fratura e inserção e, as flagelares quanto a tamanho, calibre, enrolamentos, dobraduras e duplicações, além da presença de gotas citoplasmáticas nos espermatozóides (Derivaux, 1980).

O acrossoma pode apresentar vários defeitos, como “Knobet defect”, enrugado, destacado. Sendo, a maioria, identificados por irregularidades em sua

margem (Chenoweth, 2005). Os vários níveis de cauda dobrada e enrolada estão entre os defeitos espermáticos mais comuns (Chenoweth, 2005).

Kato *et al.* (1996) sugeriram que a maioria das gotas citoplasmáticas no sêmen caprino se desprende durante o trânsito pela uretra e/ou imediatamente após a ejaculação e que sua desintegração ocorre em poucos minutos. Sua presença na peça intermediária ou destacada é uma das principais causas de infertilidade em suínos (Thundathil *et al.*, 2001).

As anormalidades espermáticas foram primeiro classificadas em primárias, ocorridas durante a espermatogênese, e secundárias, desenvolvidas após a espermição. Posteriormente, foram classificadas em defeitos maiores, deletérios à fertilidade, e os menores, com menor consequência sobre a fertilidade (Pesch e Bergmann, 2006).

Existe correlação entre a morfologia espermática e a fertilidade, principalmente quando existem defeitos acrossomais (Foote, 2003). Esta correlação, depende da qualidade do sêmen examinado e a metodologia empregada na avaliação (Rodriguez-Martinez, 2005). As anormalidades espermáticas podem reduzir a fertilidade por não permitir a chegada do espermatozóide ao local da fecundação, bem como, incapacitar a fecundação ou o desenvolvimento embrionário inicial (Chenoweth, 2005).

Segundo Chenoweth (2005), as anormalidades espermáticas podem ser causadas, principalmente, por fatores ambientais e ou genéticos. Silva e Nunes (1988) observaram maior ocorrência de patologias espermáticas, no sêmen caprino, durante a época seca e em bodes com bolsa escrotal sem bipartição.

Oyeyemi *et al.* (2006) estudaram o nível de anormalidades morfológicas que podem ocorrer com ejaculações sucessivas em caprinos e concluíram que a ejaculação freqüente resulta em liberação de espermatozoides imaturos com gota citoplasmática.

Soylu *et al.* (2003) constataram 9,1% de defeitos totais em esfregaços de sêmen caprino fresco corado por eosina-nigrosina. Já Gubartallah *et al.* (2004) observaram, no esfregaço de caprinos Saanen, uma média de 15,49% de espermatozóide mortos e 8,56% de anormalidades espermáticas.

Singh *et al.* (1995), avaliaram o sêmen caprino congelado em TRIS-gema-glicerol e observaram 45% de motilidade progressiva, constatando alterações morfológicas principalmente relacionadas ao acrossoma e flagelo.

A viabilidade espermática está relacionada à integridade da membrana plasmática (Chemineau *et al.*, 1991; Evans e Maxwell, 1990). Esta pode ser avaliada por meio de colorações vitais, onde os espermatozoides que possuem integridade de membrana, não são corados (vivos) e os que possuem danos na membrana permitem a entrada do corante no citoplasma (mortos) (Bearden e Fuquay, 1992; Derivaux, 1980; Colas, 1980). Dentre os corantes utilizados podemos citar a eosina-nigrosina (Derivaux, 1980; Evans e Maxwell, 1990; Chemineau *et al.*, 1991; Bearden e Fuquay, 1992), azul de tripan, Giemsa (Bearden e Fuquay, 1992) e azul de bromofenol (Derivaux, 1980; Medeiros, 2004).

Nur *et al.* (2005), trabalhando com sêmen fresco de bodes Saanen observaram uma média de 12,7% de espermatozoides mortos corados pela eosina-nigrosina, 9,7% de defeitos totais de espermatozoides corados pelo Giemsa e 62% de motilidade subjetiva.

Brito *et al.* (2003) avaliaram a integridade do plasmalema do sêmen descongelado de bovinos, por meio das colorações vitais eosina-nigrosina e azul de tripan e, por meio de colorações fluorescentes; observaram uma alta correlação entre as colorações vitais e fluorescentes, entretanto, as últimas foram mais sensíveis para identificar os danos de membrana. Pintado *et al.* (2000) constataram equivalência na proporção de espermatozoides, suínos e bovinos não viáveis identificados comparando colorações vitais de citossol com sondas fluorescentes.

Sprecher e Coe (1996) estudando as diferenças entre avaliações morfológicas de sêmen bovino utilizando a coloração de eosina-nigrosina em microscopia de campo claro, preparação úmida em microscopia de contraste de fase e método de Feulgen, concluíram que os dois últimos métodos, mais complexos, não são necessários para exames andrológicos de rotina.

3. JUSTIFICATIVA

A água de coco pode exercer uma ação benéfica sobre a conservação celular, entretanto, o número de estudos realizados no sentido de testar a eficiência da água de coco e sua viabilidade ainda é escasso, especialmente na criopreservação do sêmen caprino.

O problema consiste no fato de que a água de coco é um produto oriundo de vegetações tipicamente tropicais, o que limita a sua difusão em trabalhos em regiões de clima temperado. Além de ser susceptível a contaminação após sua retirada do fruto e, por isso, de difícil conservação. Vale ressaltar a necessidade de pessoas aptas a identificar o estágio de frutificação ideal para uso como conservante celular. Neste sentido, a estabilização da água de coco na forma de pó (ACP) facilitará a sua utilização, bem como a sua difusão para regiões que não disponham da matéria-prima (coco).

Com o advento do Mal da Vaca Louca e da Gripe Aviária surgiu a procura por meios diluentes e de criopreservação isentos de produtos de origem animal. Por ser a água de coco um produto vegetal, a procura pela mesma vem crescendo a cada dia e necessário se faz o estabelecimento de protocolos de congelação do sêmen caprino adequados ao referido meio.

A análise dos parâmetros cinéticos espermáticos avaliados por meio de sistemas de análise seminal auxiliada por computador é bastante influenciada pela concentração da dose de sêmen em caprinos levando à necessidade de uma re-diluição para uma melhor captura da imagem individualizada do espermatozóide pela câmera. A busca por soluções de re-diluição que não influenciem os parâmetros cinéticos espermáticos se faz então necessária.

A carência de estudos relacionados à utilização de corantes vitais na análise da morfologia e integridade de espermatozoides caprinos pós-descongelação levaram à busca por colorações mais baratas e eficientes, que possam ser conservados à temperatura ambiente e apresentem fácil emprego.

4. HIPÓTESES

A água de coco em pó (ACP-101) pode ser utilizada como meio de criopreservação de sêmen de caprinos em protocolos de congelação, podendo se igualar ou superar os meios tradicionais *in vitro*.

Soluções utilizadas para re-diluir o sêmen caprino pós-descongelação podem influenciar os parâmetros cinéticos espermáticos.

O corante vital azul de bromofenol é eficiente na análise da morfologia e integridade de membrana do sêmen caprino pós-descongelação, apresentando uma melhor relação custo-benefício.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral:

Avaliar “in vitro” o sêmen caprino congelado nos meios diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS (hidroxi-metil amino metano).

5.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito de soluções para re-diluição das amostras de sêmen pós-descongelamento por meio de parâmetros cinéticos mensurados pelo sistema SCA;
- Avaliar a morfologia e a integridade de membrana de espermatozoides caprinos frescos, diluídos e congelados em meios diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS;
- Comparar a eficiência do corante azul de bromofenol com o corante clássico de eosina-nigrosina na avaliação morfológica de espermatozoides caprinos frescos e pós-descongelamento.

CAPÍTULO 1

Artigo 1. Efeito de meios de re-diluição pós-descongelação sobre a cinética de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS

A ser enviado para a Revista Brasileira de Ciência Veterinária
INSS: 1413-0130

Artigo 1. Efeito de meios de re-diluição pós-descongelação sobre a cinética de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS

Resumo

O trabalho teve como objetivos avaliar “in vitro” o sêmen caprino congelado nos meios diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS (hidroxi-metil amino metano) e analisar o efeito de soluções para re-diluição das amostras de sêmen pós-descongelação por meio de parâmetros cinéticos mensurados pelo sistema Sperm Class Analyser[®]. Foram utilizados 04 bodes. Os diluentes utilizados foram: ACP-101 (+ 2,5% gema ovo + 7% glicerol) e TRIS (+ 20% gema ovo + 6,8% glicerol). O sêmen foi coletado por meio de vagina artificial e, avaliados quanto a: volume, concentração, motilidade massal, porcentagem de espermatozoides móveis, motilidade individual progressiva. Em seguida, cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas iguais, sendo então diluídas nos tratamentos experimentais ACP-101 e TRIS. As amostras foram refrigeradas até 4°C, glicerolizadas, envasadas em palhetas, congeladas em vapores de nitrogênio (-100°C), armazenadas em botijão criogênico (-196°C) e, após 30 dias, descongeladas. As avaliações de motilidade espermática auxiliada por computador foram realizadas aos 5, 60 e 120 minutos pós-descongelação. Para re-diluição pós-descongelação foram utilizados diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS sem gema e sem glicerol), soluções de Ringer Lactato (RL) e de NaCl a 0,9% (SF). Três palhetas de cada tratamento por ejaculado foram descongeladas, sendo cada uma avaliada e re-diluída, com uma das três soluções de re-diluição (DB, RL ou SF), até uma concentração de 20-50.10⁶ spz/ml. Os parâmetros de motilidade espermática auxiliada por computador analisados foram: motilidades total (MT) (%) e progressiva (MP) (%), velocidades média do trajeto do espermatozóide (VAP) (µm/s) e linear (VSL) (µm/s), e população de espermatozoides rápidos (ER) (%). Os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de Duncan com 5% de probabilidade. Independentemente da variável cinética estudada, o tratamento ACP x RL apresentou-se significativamente inferior aos demais durante o teste de termo-resistência. O diluente à base de TRIS apresentou resultados cinéticos significativamente superiores ao ACP-101 aos 60 e 120 minutos. Os espermatozoides diluídos e congelados no TRIS não sofreram influência das soluções de re-diluição pós-descongelação. Conclui-se que os efeitos

das soluções de re-diluição sobre a cinética espermática são relacionados ao diluente utilizado na congelação do sêmen caprino. Os parâmetros cinéticos, após cinco minutos de incubação a 37°C, de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio diluente à base de ACP-101 demonstram a potencialidade deste meio na criopreservação seminal caprina. O diluente à base de TRIS promoveu maior viabilidade *in vitro* de espermatozoides caprinos pós-descongelação.

Palavras-chave: caprinos; espermatozoides; diluentes; água de coco em pó; TRIS; pós-descongelação.

Article 1. Effect of post-thaw redilution media on the kinetic of goat spermatozoa frozen in media based on powder coconut water (PCW-101) or TRIS

Abstract

The aims of the work were to evaluate “in vitro” the goat semen frozen in diluents media based on powder coconut water (PCW-101) and TRIS (hydroxymethyl amino methane), analyze the effect of solution for redilution of semen samples post-thawing through kinetic parameters measured by Sperm Class Analyser[®]. Four goats were utilized. The employed diluents were: PCW-101 (+ 2.5% egg yolk + 7% glycerol) and TRIS (+ 20% egg yolk + 6.8% glycerol). The ejaculateds were collected using artificial vagina, assessed for: volume, concentration, mass motility, percentage of motile spermatozoa, and progressive individual motility. Right away, each ejaculate was divided into two aliquots and diluted into the experimental treatments PCW-101 and TRIS. The samples were refrigerated to 4°C, glycerolated, loaded into straws, frozen into nitrogen vapors (-100°C), stored into cryogenic tank (-196°C) and thawed after 30 days. The spermatic motility evaluations assisted by computer were placed into 5, 60 and 120 minutes post-thawing. For redilution post-thawing were utilized basis diluent (BD: PCW-101 or TRIS without yolk and without glycerol), Ringer Lactate solutions (RL) and 0.9% NaCl (PS). Three straws from each treatment by ejaculated were thawed, being each an evaluated and rediluted, with one of the three solutions for redilutions, respectively. The motion parameters assisted by computer assessed were: total motility (TM) (%), progressive motility (PM) (%), average path velocity (VAP) (µm/s), straight linear velocity (VSL) (µm/s), and population of rapid spermatozoa (RS) (%). The data were analyzed using ANOVA and Duncan’s with 5% of probability (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Independently of the kinetic variable studied, the treatment PCW x RL showed significantly inferior to the other during the thermo resistance test. The spermatozoa diluted and frozen on TRIS didn’t suffer the redilution solution influence post-thaw. The media based on TRIS showed kinetic results significantly superior to PCW-101, to the 60 and 120 min. It can be concluded that the redilution solution effects on the spermatic kinetic are related to the media used to frozen goat semen. Kinetic parameters, after five minutes incubated at 37°C, of goat spermatozoa diluted and frozen on media based on PCW-101 showed the potentiality of this media on buck seminal cryopreservation. The

media based on TRIS promoted better *in vitro* viability post-thawing from goat spermatozoa.

Keywords: goat; spermatozoa; diluent; powder coconut water; TRIS; post-thaw.

EFEITO DE MEIOS DE RE-DILUIÇÃO PÓS-DESCONGELAÇÃO SOBRE A CINÉTICA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS CONGELADOS EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-101) OU TRIS

[Effect of post-thaw redilution media on the kinetic of goat spermatozoa frozen in media based on powder coconut water (PCW-101) or TRIS]

Rodrigo Vasconcelos de Oliveira^{*} ; José Ferreira Nunes^{*} ; Cristiane Clemente de Mello Salgueiro^{*} ; José Maurício Maciel Cavalcante^{*} ; Oscar Oliveira Brasil^{} ; Jullio da Costa Batista Parente^{**} ; Raphael Fernando Braga Gonçalves^{**} ; Carlos André da Penha Mendes Batista^{**} ; Arlindo Alencar de Araripe Moura^{***}**

^{*} Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará
Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60.740-000, Fortaleza-CE
e-mail: rodrigovetbio123@yahoo.com.br

^{**} Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará

^{***} Programa de Pós-graduação em Zootecnia Universidade Federal do Ceará

Resumo

O trabalho teve como objetivos avaliar “in vitro” o sêmen caprino congelado nos meios diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS (hidroxi-metil amino metano) e analisar o efeito de soluções para re-diluição das amostras de sêmen pós-descongelação por meio de parâmetros cinéticos mensurados pelo sistema Sperm Class Analyser[®]. Foram utilizados 04 bodes. Os diluentes utilizados foram: ACP-101 (+ 2,5% gema ovo + 7% glicerol) e TRIS (+ 20% gema ovo + 6,8% glicerol). O sêmen foi coletado por meio de vagina artificial e, avaliados quanto a: volume, concentração, motilidade massal, porcentagem de espermatozóides móveis, motilidade individual progressiva. Em seguida, cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas iguais, sendo então diluídas nos tratamentos experimentais ACP-101 e TRIS. As amostras foram refrigeradas até 4°C, glicerolizadas, envasadas em palhetas, congeladas em vapores de nitrogênio (-100°C), armazenadas em botijão criogênico (-196°C) e, após 30 dias, descongeladas. As avaliações de motilidade espermática auxiliada por computador foram realizadas aos 5, 60 e 120 minutos

pós-descongelamento. Para re-diluição pós-descongelamento foram utilizados diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS sem gema e sem glicerol), soluções de Ringer Lactato (RL) e de NaCl a 0,9% (SF). Três palhetas de cada tratamento por ejaculado foram descongeladas, sendo cada uma avaliada e re-diluída, com uma das três soluções de re-diluição (DB, RL ou SF), até uma concentração de $20-50 \cdot 10^6$ spz/ml. Os parâmetros de motilidade espermática auxiliada por computador analisados foram: motilidades total (MT) (%) e progressiva (MP) (%), velocidades média do trajeto do espermatozóide (VAP) ($\mu\text{m/s}$) e linear (VSL) ($\mu\text{m/s}$), e população de espermatozoides rápidos (ER) (%). Os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de Duncan com 5% de probabilidade. Independentemente da variável cinética estudada, o tratamento ACP x RL apresentou-se significativamente inferior aos demais durante o teste de termo-resistência. O diluente à base de TRIS apresentou resultados cinéticos significativamente superiores ao ACP-101 aos 60 e 120 minutos. Os espermatozoides diluídos e congelados no TRIS não sofreram influência das soluções de re-diluição pós-descongelamento. Conclui-se que os efeitos das soluções de re-diluição sobre a cinética espermática são relacionados ao diluente utilizado na congelamento do sêmen caprino. Os parâmetros cinéticos, após cinco minutos de incubação a 37°C , de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio diluente à base de ACP-101 demonstram a potencialidade deste meio na criopreservação seminal caprina. O diluente à base de TRIS promoveu maior viabilidade *in vitro* de espermatozoides caprinos pós-descongelamento.

Palavras-chave: caprinos; espermatozoides; diluentes; água de coco em pó; TRIS; pós-descongelamento.

Abstract

The aim of the work was: to evaluate “in vitro” the goat semen frozen in diluents media based on powder coconut water (PCW-101) and TRIS (hydroxymethyl amino methane), analyze the effect of solution for redilution of semen samples post-thawing through kinetic parameters measured by Sperm Class Analyser[®]. Four goats were utilized. The employed diluents were: PCW-101 (+ 2.5% egg yolk + 7% glycerol) and TRIS (+ 20% egg yolk + 6.8% glycerol). The ejaculateds were collected using

artificial vagina, assessed for: volume, concentration, mass motility, percentage of motile spermatozoa, and progressive individual motility. Right away, each ejaculate was divided into two aliquots and diluted into the experimental treatments PCW-101 and TRIS. The samples were refrigerated to 4°C, glycerolated, loaded into straws, frozen into nitrogen vapors (-100°C), stored into cryogenic tank (-196°C) and thawed after 30 days. The spermatoc motility evaluations assisted by computer were placed into 5, 60 and 120 minutes post-thawing. For redilution post-thawing were utilized basis diluent (BD: PCW-101 or TRIS without yolk and without glycerol), Ringer Lactate solutions (RL) and 0.9% NaCl (PS). Three straws from each treatment by ejaculated were thawed, being each an evaluated and rediluted, with one of the three solutions for redilutions, respectively. The motion parameters assisted by computer assessed were: total motility (TM) (%), progressive motility (PM) (%), average path velocity (VAP) ($\mu\text{m/s}$), straight linear velocity (VSL) ($\mu\text{m/s}$), and population of rapid spermatozoa (RS) (%). The data were analyzed using ANOVA and Duncan's with 5% of probability (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Independently of the kinetic variable studied, the treatment PCW x RL showed significantly inferior to the other during the thermo resistance test. The media based on TRIS showed kinetic results significantly superior to PCW-101, to the 60 and 120 min. The spermatozoa diluted and frozen on TRIS didn't suffer the redilution solution influence post-thaw. It can be concluded that the redilution solution effects on the spermatoc kinetic are related to the media used to frozen goat semen. Kinetic parameters, after five minutes incubated at 37°C, of goat spermatozoa diluted and frozen on media based on PCW-101 showed the potentiality of this media on buck seminal cryopreservation. The media based on TRIS promoted better viability post-thawind from goat spermatozoa.

Keywords: goat; spermatozoa; diluent; powder coconut water; TRIS; post-thaw.

Introdução

Devido aos excelentes resultados obtidos com os estudos da água de coco "in natura" na conservação de espermatozoides (Nunes, 1986; Salles, 1989, Araújo, 1990, Toniolli e Mesquita, 1990, Montezuma Jr. *et al.*, 1994), objetivou-se a elaboração de um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP), caracterizado pela padronização e estabilização da água de coco por meio de um

processo de desidratação e, subsequente formulação de meios de conservação específicos para célula e tecidos (Nunes e Salgueiro, 2005).

Após o processo de preservação, as células espermáticas devem apresentar boa motilidade a fim de alcançar o local da fecundação e manter a integridade das membranas espermáticas para poder levar a cabo a penetração do ovócito (Royere, 1996). As injúrias causadas pela criopreservação são prejudiciais ao transporte e sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino (Salamon e Maxwell, 1995).

Classicamente, o julgamento da qualidade seminal tem sido baseado em uma avaliação subjetiva de parâmetros como motilidades massal e individual, os quais são considerados uma expressão da viabilidade e integridade estrutural dos espermatozóides (Verstegen *et al.*, 2002). Mack *et al.* (1988) ressaltaram que a necessidade de uma metodologia objetiva motivou a elaboração e desenvolvimento de instrumentos automatizados, capazes de analisar as trajetórias dos espermatozóides, surgindo a análise de sêmen auxiliada por computador (CASA) (Amann e Katz, 2004).

Vários fatores podem influenciar a motilidade avaliada por sistemas de CASA, entre os quais temperatura, processamento seminal (diluição, resfriamento, congelação-descongelação) e concentração espermática. Esta última deve permanecer entre 20 a $50 \cdot 10^6$ spz/ml (Vertegen *et al.*, 2002).

Vários meios têm sido utilizadas para re-diluir o sêmen, a concentrações ideais, para avaliação por meio do CASA, entre os quais citrato de sódio 2,9% (Bag *et al.*, 2003), solução salina associada ao TRIS (Purdy, 1996), solução de TRIS (Aboagla e Terada, 2003), TALP (Tyrode's-albumina-lactato-piruvato) (Farrel *et al.*, 1998). Entretanto existe uma carência de estudos avaliando o efeito de diferentes soluções, para re-diluição de sêmen congelado, sobre os parâmetros de motilidade avaliados por meio de CASAs.

O trabalho teve como objetivos: avaliar "in vitro" o sêmen caprino congelado nos meios diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS (hidroxi-metil amino metano) e analisar o efeito de soluções para re-diluição das amostras de sêmen pós-descongelação por meio de parâmetros cinéticos mensurados pelo sistema Sperm Class Analyser[®] (SCA, Microptic S.L., versão 3.2.0).

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará, no município de Fortaleza, Ceará, com latitude 03°43' Sul e longitude 38°30' Oeste, com temperatura média anual de 27°C. Foram utilizados 04 bodes, dois da raça Saanen e dois da raça Boer. Os animais foram mantidos em confinamento, em baias individuais. A alimentação consistiu de feno de tifton (*Cynodon* sp.) e ração comercial com 18% proteína bruta, sal mineral e água à vontade.

Preparação dos diluentes

O diluente à base de água de coco em pó (ACP-101), com pH 6,8 e 300 mOsm/Kg para sêmen caprino, era constituído por água de coco em pó acrescida de tampões, 100 ml de água destilada, 40 mg de gentamicina, 2,5% de gema de ovo e 7% de glicerol. O diluente foi dividido em duas frações: "A" sem glicerol e "B" com 14% glicerol (Salgueiro *et al.*, 2003).

O diluente à base de TRIS, com pH 6,8 e 300 mOsm/Kg, era constituído por : 3,786 g de Tris, 2,11 g de ácido cítrico, 100 ml de água destilada, 40 mg de gentamicina, 1% de frutose, 20% de gema de ovo e 6,8% de glicerol. O diluente foi dividido em duas frações: "A" sem glicerol e "B" com 13,6% de glicerol (Singh *et al.*, 1995).

Coleta e processamento seminal

O sêmen foi coletado na presença de uma fêmea em cio induzido por uma injeção prévia, com 48 de antecedência ao procedimento, de Benzoato de Estradiol (Estrogin[®]), por meio de vagina artificial (IMV[®]) aquecida a 40-42°C e lubrificada com glicerina. Está continha um cone de borracha, acoplado a um tubo coletor Falcon de 15 ml. A coleta de sêmen realizou-se duas vezes por semana perfazendo um total de 12 ejaculados por animal, totalizando 48 ejaculados. Após cada coleta, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 30°C enquanto se realizou a avaliação seminal.

O volume do ejaculado (ml) foi mensurado por meio da observação direta do tubo coletor graduado.

A avaliação de motilidade massal (MM) realizou-se por meio da avaliação de uma gota de 5µl de sêmen puro em lâmina, previamente aquecida a 37°C, sob aumento de 100x em microscópio de contraste de fase: sendo classificada de 0 a 5 (Chemineau *et al.*, 1991).

Para avaliação da porcentagem de espermatozóides móveis (PEM) e motilidade individual progressiva (MIP) (0-5), 10µl de sêmen puro foram diluídos em 500µl de

solução fisiológica de NaCl a 0,9% mantida também no banho-maria a 30°C, sendo, logo após a homogeneização conduzida uma alíquota 10µl a uma lâmina, previamente aquecida a 37°C, sob aumento de 400x em microscópio de contraste de fase: sendo a PEM atribuída em valores de porcentagem e a MIP classificada de 0 a 5 (Chemineau *et al.*, 1991).

Após a avaliação da MM, PEM e MIP cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas iguais, sendo então acondicionadas em tubos de ensaio de 15 ml. Estas formaram dois tratamentos experimentais: ACP-101 e TRIS, sendo submetidas a uma pré-diluição na taxa de 1:2 (sêmen:fração A diluente) (v/v), a 30°C.

A concentração espermática ($\times 10^9$ spz/ml) foi mensurada por meio do método de espectrofotometria, diluindo 10µl de sêmen puro em 4 ml de solução de folmaldeído a 0,1% (taxa de diluição 1:400 v/v) (Sorensen, 1982).

Após a mensuração da concentração espermática de cada ejaculado, foi calculada a quantidade das frações A e B de cada diluente. Todos os grupos foram submetidos à segunda diluição a 30°C, pela adição do volume restante da fração "A" de cada diluidor. Posteriormente, as amostras de sêmen diluído, acondicionadas em tubos de ensaio de 15 ml vedados com tampa de borracha, foram levadas a um recipiente plástico contendo 200 ml de água a 30 °C. Sendo, então, o conjunto refrigerado em um freezer horizontal (Prosdócimo[®]), durante 120 minutos, até alcançar 4°C a uma velocidade média de refrigeração de 0,22°C/minuto. A curva de refrigeração foi monitorada com um termômetro digital (HEADterm 200[®]).

Uma vez alcançando 4°C, realizou-se a terceira diluição adicionando-se o volume da fração "B", previamente calculado, de cada diluente em três etapas, com intervalos de cinco minutos, até alcançar uma concentração final de 400×10^6 spz/ml, com mais 5 minutos de tempo de equilíbrio.

O sêmen diluído e resfriado a 4°C, de todos os grupos, foi envasado em palhetas francesas de 0,25 ml (com 100×10^6 espermatozóides cada), previamente identificadas e refrigeradas a 4°C. O envase foi realizado em uma estante dentro do freezer horizontal.

As palhetas dos tratamentos ACP-101 e TRIS, com sêmen diluído e refrigerado a 4°C, foram colocadas em rampa de congelação, distante 3,5 cm do nível do nitrogênio líquido (N₂L), onde se congelaram nos vapores (-100°C) por dez minutos, posteriormente sendo submersas em N₂L a -196°C, acondicionadas em globetes fixados em racks identificadas, sendo então armazenadas em botijão criogênico.

Decorridos 30 dias após a congelação, foram retiradas do botijão criogênico amostras de palhetas para descongelação. As palhetas foram imersas em banho-maria a 37°C, durante 30 segundos. Descongeladas, as amostras, foram acondicionadas em tubos Eppendorf®, e mantidas a 37 °C por 120 minutos, para realização do teste de termo-resistência, (Chemineau *et al.*, 1991; CBRA, 1998). As avaliações de motilidade espermáticas auxiliada por computador foram realizadas aos 5, 60 e 120 minutos pós-descongelação. Para re-diluição pós-descongelação foram utilizados diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS sem gema e sem glicerol), soluções de Ringer Lactato (RL) e de NaCl a 0,9% (SF). Três palhetas de cada tratamento por ejaculado foram descongeladas, sendo cada uma avaliada e re-diluída, com uma das três soluções de re-diluição (DB, RL ou SF), até uma concentração de 20-50.10⁶ sptz/ml. Para tanto, no momento de cada análise, uma alíquota de 5 µl de cada amostra foi re-diluída e homogeneizada em um segundo Eppendorf contendo 100µl de uma das soluções a 37°C, assim 5 µl da amostra re-diluída era colocada em Câmara de Makler® (Sel-Medical Instruments), previamente aquecida a 37°C, para as análises de motilidade espermática auxiliada por computador.

A motilidade espermática auxiliada por computador foi analisada com o auxílio de microscópio de contraste de fases acoplado a uma vídeo-câmara adaptada ao sistema Sperm Class Analyser® (SCA, Microptic S.L., versão 3.2.0), e foram avaliadas a motilidade total (MT) (%), a motilidade progressiva (MP) (%), a velocidade média do trajeto do espermatozóide (VAP) (µm/s), a velocidade linear (VSL) (µm/s) e a população de espermatozoides rápidos (ER) (%).

Para a análise estatística, foi utilizado o programa SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA), sendo os ejaculados considerados repetições para as variáveis estudadas. Depois de comprovar a distribuição normal das variáveis e de aplicar as transformações necessárias, foram realizadas as seguintes provas:

Análise de variância de duas vias, tomando-se como efeito fixo: diluente x solução de re-diluição pós-descongelação, e como efeitos variáveis: MT, MP, VAP, VSL e ER. Para se obter diferenças significativas entre as médias nos casos em que a análise de variância revelou efeito significativo foi utilizado o teste de Duncan para a comparação múltipla de médias. Os dados são apresentados como médias e se considerou significativa uma diferença de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Os parâmetros do sêmen fresco dos quatro bodes avaliados foram: volume, concentração espermática (Conc. Sptz), motilidade massal (MM), porcentagem de espermatozóides móveis (PEM) e motilidade individual progressiva (MIP) (tabela 1). Todos os animais possuíam características seminais normais para a espécie, de acordo com o CBRA (1998), Chemineau *et al.* (1991) e Evans e Maxwell (1990).

Tabela 1. Parâmetros (média \pm dp) do sêmen fresco de quatro bodes.

Bode	Volume (ml)	Conc. Sptz (10⁹/ml)	MM (0-5)	PEM (%)	MIP (0-5)
1	0,78 \pm 0,21	5,41 \pm 0,54	3,83 \pm 0,54	81,25 \pm 6,44	3,71 \pm 0,45
2	0,74 \pm 0,23	5,53 \pm 0,42	3,79 \pm 0,45	82,50 \pm 3,37	3,50 \pm 0,37
4	0,57 \pm 0,11	5,47 \pm 0,40	4,08 \pm 0,47	87,92 \pm 3,96	4,00 \pm 0,43
5	0,69 \pm 0,28	4,35 \pm 0,88	3,42 \pm 0,36	82,08 \pm 3,96	3,71 \pm 0,45
Total	0,69 \pm 0,23	5,19 \pm 0,75	3,78 \pm 0,50	83,44 \pm 5,17	3,73 \pm 0,45

$p > 0,05$.

Os dados relacionados com a avaliação da motilidade auxiliada por computador de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, e re-diluídos no próprio diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS; sem gema; sem glicerol), ou solução de Ringer Lactato (RL) ou solução de NaCl a 0,9% (SF), após 5 minutos do teste de termo-resistência estão ilustrados na Tabela 2.

Tabela 2. Análise auxiliada por computador da motilidade de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco (ACP-101) e TRIS, e re-diluídos no próprio diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS; sem gema; sem glicerol), ou solução de Ringer Lactato (RL) ou solução de NaCl a 0,9% (SF), após 5 minutos do teste de termo-resistência.

Re-diluição	MT (%)	MP (%)	ER (%)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
ACP x ACP	54,48 \pm 16,49 ^{aA}	27,10 \pm 11,32 ^{aA}	18,73 \pm 11,53 ^{aB}	40,39 \pm 10,38 ^{aB}	47,39 \pm 11,80 ^{aB}
ACP x RL	38,03 \pm 15,68 ^{bB}	9,95 \pm 7,77 ^{bB}	11,79 \pm 10,07 ^{bB}	21,18 \pm 11,18 ^{bB}	29,44 \pm 12,56 ^{bB}
ACP x SF	48,15 \pm 16,35 ^{aA}	24,61 \pm 11,89 ^{aA}	16,35 \pm 9,10 ^{bB}	35,95 \pm 11,31 ^{bB}	42,33 \pm 11,60 ^{bB}
TRIS x TRIS	54,60 \pm 16,29 ^{aA}	30,95 \pm 12,46 ^{aA}	27,51 \pm 12,48 ^{aA}	47,87 \pm 10,54 ^{aA}	55,57 \pm 10,56 ^{aA}
TRIS x RL	50,15 \pm 15,93 ^{aA}	23,73 \pm 11,24 ^{aA}	30,44 \pm 14,34 ^{aA}	52,14 \pm 14,26 ^{aA}	64,05 \pm 15,86 ^{aA}
TRIS x SF	49,82 \pm 13,56 ^{aA}	22,83 \pm 10,70 ^{aA}	27,79 \pm 15,55 ^{aA}	53,93 \pm 16,13 ^{aA}	65,91 \pm 17,41 ^{aA}

Letras minúsculas entre linhas, diferença entre soluções de re-diluição dentro de cada diluente ($p < 0,05$); letras maiúsculas entre linhas, diferença entre soluções de re-diluição entre diluentes ($p < 0,05$).

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; ER = população de espermatozóides rápidos; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média do trajeto do espermatozóide.

Independentemente da variável cinética estudada, o tratamento ACP x RL apresentou-se significativamente inferior aos demais aos 5 minutos do teste de termo-resistência. Com relação ao diluente ACP-101, a população de espermatozóides rápidos (ER), velocidade linear (VSL) e velocidade média da trajetória (VAP) apresentaram melhores resultados quando o próprio diluente base foi utilizado na re-diluição (ACP x ACP), seguido da solução fisiológica (ACP x SF). Não houve efeito do diluente em relação à motilidade total (MT) e progressiva (MP), exceto em relação ao tratamento ACP x RL. Entretanto, o diluente TRIS apresentou melhores resultados em relação aos espermatozóides rápidos (ER), velocidades linear (VSL) e média da trajetória (VAP). Os parâmetros cinéticos não foram afetados pela solução de re-diluição no sêmen pós-descongelamento no diluente TRIS.

As mesmas avaliações cinéticas foram processadas após 60 minutos do teste de termo-resistência conforme dados da Tabela 3.

Tabela 3. Análise auxiliada por computador da motilidade de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco (ACP-101) e TRIS, e re-diluídos no próprio diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS; sem gema; sem glicerol), ou solução de Ringer Lactato (RL) ou solução de NaCl a 0,9% (SF), após 60 minutos do teste de termo-resistência.

Re-diluição	MT (%)	MP (%)	ER (%)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
ACP x ACP	17,02 \pm 15,42 ^{abB}	4,71 \pm 5,55 ^{abB}	2,66 \pm 4,03 ^{abB}	15,00 \pm 11,38 ^{abB}	20,18 \pm 13,89 ^{abB}
ACP x RL	6,87 \pm 9,78 ^{bbB}	0,95 \pm 3,23 ^{bbB}	0,9 \pm 2,38 ^{bbB}	4,21 \pm 7,18 ^{cbB}	6,99 \pm 10,11 ^{bbB}
ACP x SF	12,78 \pm 11,93 ^{abB}	2,21 \pm 3,72 ^{bbB}	2,9 \pm 3,59 ^{abB}	10,78 \pm 10,76 ^{bbB}	17,51 \pm 15,22 ^{abB}
TRIS x TRIS	43,05 \pm 19,37 ^{aaA}	13,87 \pm 8,32 ^{aaA}	21,12 \pm 11,58 ^{aaA}	32,17 \pm 8,58 ^{aaA}	45,39 \pm 11,68 ^{aaA}
TRIS x RL	38,45 \pm 16,48 ^{aaA}	10,10 \pm 0,45 ^{aaA}	21,92 \pm 10,65 ^{aaA}	34,32 \pm 8,22 ^{aaA}	52,10 \pm 12,26 ^{aaA}
TRIS x SF	37,08 \pm 14,34 ^{aaA}	10,57 \pm 6,47 ^{aaA}	18,83 \pm 11,37 ^{aaA}	33,59 \pm 8,45 ^{aaA}	50,45 \pm 12,62 ^{aaA}

Letras minúsculas entre linhas, diferença entre soluções de re-diluição dentro de cada diluente ($p < 0,05$); letras maiúsculas entre linhas, diferença entre soluções de re-diluição entre diluentes ($p < 0,05$).

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; ER = população de espermatozóides rápidos; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média do trajeto do espermatozóide.

Aos 60 minutos do teste de termo-resistência o tratamento ACP x RL apresentou-se significativamente inferior aos demais, independentemente da variável cinética estudada. Com relação ao diluente ACP-101, a motilidade progressiva (MP) apresentou melhores resultados quando o próprio diluente base foi utilizado na rediluição (ACP x ACP), seguido da solução fisiológica (ACP x SF).

O diluente à base de TRIS apresentou resultados cinéticos significativamente superiores ao ACP-101. Os espermatozóides diluídos e congelados no TRIS não sofreram influência das soluções de re-diluição pós-descongelação.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados das avaliações cinéticas processadas após 120 minutos do teste de termo-resistência.

Tabela 4. Análise auxiliada por computador da motilidade de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco (ACP-101) e TRIS, e re-diluídos no próprio diluente base (DB: ACP-101 ou TRIS; sem gema; sem glicerol), ou solução de Ringer Lactato (RL) ou solução de NaCl a 0,9% (SF), após 120 minutos do teste de termo-resistência.

Re-diluição	MT (%)	MP (%)	ER (%)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
ACP x ACP	1,11 \pm 3,77 ^{ab}	0,45 \pm 1,71 ^{ab}	0,23 \pm 0,97 ^{ab}	2,5 \pm 9,68 ^{ab}	3,02 \pm 11,11 ^{ab}
ACP x RL	0,7 \pm 2,85 ^{ab}	0,19 \pm 0,81 ^{ab}	0,3 \pm 1,26 ^{ab}	1,71 \pm 7,14 ^{ab}	2,42 \pm 9,86 ^{ab}
ACP x SF	0,76 \pm 3,78 ^{ab}	0,4 \pm 1,94 ^{ab}	0,25 \pm 1,43 ^{ab}	1,48 \pm 7,19 ^{ab}	1,75 \pm 8,53 ^{ab}
TRIS x TRIS	34,18 \pm 18,26 ^{aa}	9,7 \pm 6,50 ^{aa}	15,44 \pm 10,36 ^{aa}	27,08 \pm 10,38 ^{aa}	38,31 \pm 14,41 ^{aa}
TRIS x RL	31,14 \pm 16,96 ^{aa}	7,39 \pm 4,54 ^{aa}	16,23 \pm 10,39 ^{aa}	28,31 \pm 10,65 ^{aa}	44,32 \pm 17,27 ^{aa}
TRIS x SF	30,51 \pm 14,49 ^{aa}	7,17 \pm 4,5 ^{aa}	14,75 \pm 10,86 ^{aa}	27,36 \pm 11,31 ^{aa}	43,04 \pm 16,29 ^{aa}

Letras minúsculas entre linhas, diferença entre soluções de re-diluição dentro de cada diluente ($p < 0,05$); letras maiúsculas entre linhas, diferença entre soluções de re-diluição entre diluentes ($p < 0,05$).

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; ER = população de espermatozóides rápidos; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média do trajeto do espermatozóide.

Os espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meio à base de ACP-101 não sofreram influência das soluções de re-diluição com relação aos parâmetros cinéticos avaliados aos 120 minutos do teste de termo-resistência, entretanto os mesmos se encontravam abaixo dos valores de 30% espermatozóide móveis, recomendados pelo CBRA (1998).

O efeito do diluente se manteve, onde os espermatozóides diluídos-congelados em TRIS apresentaram valores superiores em relação aos parâmetros cinéticos. Estes também não foram influenciados pelas soluções de re-diluição.

Os resultados obtidos no presente estudo com os espermatozóides diluídos em ACP-101 pós-descongelção em relação à motilidade total aos 5 minutos do teste

de termo-resistência foram semelhantes aos obtidos por Araújo e Nunes (1991) e Salgueiro (2003), que congelaram sêmen caprino em diluente à base de água de coco *in natura* acrescido de 10 e 2,5% de gema de ovo, respectivamente. Entretanto, no estudo realizado por Salgueiro (2003), os espermatozóides demonstraram valores de motilidade superiores ao final de 120 minutos do teste de termo-resistência. Salgueiro *et al.* (2003), avaliando o sêmen caprino diluído e congelado em ACP-101 com 2,5 % de gema de ovo e 7% de glicerol, obtiveram em média, após 5 minutos pós-descongelção, porcentagem de espermatozóides móveis de 33% e motilidade individual progressiva 2,48.

A re-diluição em solução de Ringer Lactato foi deletéria para o sêmen caprino diluído e congelado em ACP-101, fato que pode ter sido ocasionado pelo elevado teor de cálcio (Ca^{++}) após a re-diluição proveniente da associação do Ca^{++} contido na solução de RL e no diluente ACP-101. Assim o influxo de Ca^{++} para o espermatozóide promoveria uma desestabilização da membrana, podendo induzir a capacitação (Bailey *et al.*, 2000).

Os resultados de motilidade progressiva (MP) espermática aos cinco minutos pós-descongelção, quantificados pelo sistema SCA no presente estudo, foram inferiores aos obtidos por Sinha *et al.* (1996), que observaram subjetivamente, pós-descongelção, motilidade progressiva de 47% em espermatozóides caprinos lavados e congelados em meio diluente à base de TRIS com 20% de gema. Hidalgo *et al.* (2006) avaliando as motilidades total e progressiva por meio de sistemas de CASA, no sêmen caprino diluído e congelado em TRIS com 20% gema, constataram 57,63% e 33,42%, respectivamente.

Aboagla e Terada (2003), criopreservaram sêmen caprino lavado no diluente TRIS-glicose-ácido cítrico com 20% de gema e 8% de glicerol e observaram à descongelção, re-diluindo o sêmen em solução de TRIS, na avaliação da motilidade espermática auxiliada por computador, 62% de motilidade total, 49% de motilidade progressiva e VAP de 81,0 $\mu\text{m/s}$.

Entretanto, Ferrari e Barnabé (1999), congelando sêmen caprino com diluente à base de TRIS com 2,6% gema, obtiveram resultados de motilidade, independente da retirada ou não do plasma seminal, de cerca de 30% logo após a descongelção, e ressaltando a baixa termo-resistência ao longo da incubação. Resultados semelhantes também foram apresentados por Azêredo *et al.* (2001), congelando

sêmen caprino diluído em TRIS com 2,6%, obtendo média de motilidade total de 28,33%.

O processo de criopreservação do sêmen caprino tem um efeito deletério sobre as motilidades total e progressiva e sobre a velocidade média da trajetória (Sundaraman e Edwin, 2006). Cavalcante (2003), avaliando o sêmen fresco e pós-descongelamento de bodes da raça Boer por meio de um sistema CASA, constatou, em relação às motilidades total e progressiva, valores de 93% e 64% no sêmen fresco, e 51% e 21% pós-descongelamento, respectivamente. Tuli e Holtz (1995) calcularam que o percentual de redução de motilidade progressiva subjetiva em sêmen caprino do fresco para o pós-descongelamento foi em torno de 46%. Azêredo *et al.* (2001) constataram diminuição da motilidade pós-descongelamento do sêmen caprino lavado, e que o processo de criopreservação teve um efeito deletério sobre a qualidade do movimento espermático.

A gema de ovo é um crioprotetor externo, adicionado aos diluentes seminais, visando uma proteção não apenas relacionada aos danos oriundos do resfriamento (Evans e Maxwell, 1990; Purdy, 2005) como também as crioinjúrias produzidas pela etapa de congelamento (Aboagla e Terada, 2004). Comparando-se os meios diluentes utilizados no presente trabalho, observa-se uma maior quantidade de gema no meio à base de TRIS, diferença que pode ter promovido sua maior proteção às crioinjúrias.

Conclusões

Os efeitos das soluções de re-diluição sobre a cinética espermática estão relacionados ao diluente utilizado na congelamento do sêmen caprino.

As soluções de re-diluição não influenciaram os parâmetros cinéticos sobre os espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de TRIS.

O diluente à base de TRIS promoveu maior viabilidade *in vitro* de espermatozoides caprinos quando comparado ao diluente ACP-101.

Os parâmetros cinéticos, após cinco minutos de incubação a 37°C, de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio diluente à base de ACP-101 demonstram a potencialidade deste meio na criopreservação seminal de bodes, abrindo perspectivas futuras para o emprego deste meio.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio recebido pela CAPES, CNPq, FUNCAP e FUNECE. Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de Rodrigo Vasconcelos de Oliveira.

Referências Bibliográficas

- ABOAGLA, E.M.E., TERADA, T. Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1245-1250, 2003.
- ABOAGLA, E.M.E., TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing steps of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, n.1160-1172, 2004.
- AMANN, R.P., KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, v.25, n.3, p.317-325, 2004.
- ARAUJO, I.S. *Utilização da água de coco e do leite glicosado como diluidor do sêmen ovino*. Fortaleza, 1990. 35p. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1990).
- ARAÚJO, A. A., NUNES, J.F. Utilização da água de coco “in natura” adicionada de gema de ovo como diluente do sêmen caprino. *Ciência Animal*, Fortaleza, v.1, p.39-49, 1991.
- AZÊREDO, G.A.; ESPER, C.R.; RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research*, v.41, p.257-263, 2001.
- BAG, S., JOSHI, A., RAWAT, P.S., MITTAL, J.P. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in semi-arid tropical environment. *Small Ruminant Research*, v.43, p.23-29, 2003.
- BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal of Andrology*, v.21, p.1-7, 2000.
- CAVALCANTE, T.V. *Concentrações plasmáticas de testosterona e fertilidade de machos caprinos da raça bôer e alpina durante as estações reprodutivas e não reprodutivas*. Jaboticabal, 2003. Tese (Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2003).

- CBRA. *Manual para Exame e Avaliação de Sêmen Animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed., Belo Horizonte: CBRA, 1998, 79p.
- CHEMINEAU, P., CAGNIE, Y., GUERIN, Y., *et al.* *Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats*. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991, 222p.
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editora Acribia, S.A. Zaragoza, 1990, 192p.
- FARREL, P.B., PRESIW, G.A., BROCKETT, C.G., FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v.49, p.871-979, 1998.
- FERRARI, S., BARNABE, V.H. Effect of two kinds of diluents and two freezing methods on caprine semen quality. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.36, n.4, 1999.
- HIDALGO, M., RODRIGUEZ, I., DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometric using the sperm class analyzer. *Theriogenology*, in press, 2006.
- MACK, S., WOLF, D., TASH, J. Quantization of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. *Biology of Reproduction*, v.38, p.270-281, 1988.
- MONTEZUMA Jr., P., VIANA NETO, C., NUNES, J.F. Água de coco como diluidor de sêmen de cães In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DA UECE, *Anais...* 1994.
- NUNES, J.F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: SIMPÓSIO DA CAPRINOCULTURA DO ESTADO DO RIO, 1986, Niterói. *Anais...* Niterói.
- NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos. *Revista de Ciências Agrárias*. Belém, n.43, 2005. Suplemento.
- PURDY, P.H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.93, p.114-123, 1996.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, (in press), 2005.
- ROYERE, D., BARTHELEMY, C., HAMAMAH, S. Cryopreservation of spermatozoa: a review. *Human Reproduction Update*, v.2, p.553-559, 1996.

- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, v.38, p.1-36, 1995.
- SALGUEIRO, C.C.M. *Evaluación de diferentes diluyentes en la congelación del semen caprino*. Madri, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias da Universidad Complutense de Madrid - UCM, 2003).
- SALGUEIRO, C.C.M., NUNES, J.F., MATEOS-REX, E., et al. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento por meio do Teste Hiposmótico. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.3, p.377-378, 2003.
- SALLES, M.G.F. *Água de coco (Cocos nucifera L.) "in natura" e na forma de gel e estabilizada como diluidor do sêmen caprino*. Porto Alegre, 1989. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRS, 1989).
- SINGH, M.P., SINHA, A.K., SINGH, B.K. Effect of cyoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, v.43, p.1047-1053, 1995.
- SINHA, M.P., SINHA, A.K., PRASAD, R.L. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*. v.41, p.237-243, 1996.
- SORENSEN, A.M. Jr. *Reprodução Animal. Princípios e Práticas*. Ed. McGraw-Hill. México.
- SUNDAMARAN, M.N.; EDWIN, M.J. Cryopreservation of Boer goat spermatozoa during cryopreservation cycle. *Online Journal Of Veterinary Research*, v.10, n.21, p.117-124, 2006.
- TONIOLLI, R., MESQUITA, S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.14, p.249-254, 1990.
- TULI, R.K., HOLTZ, W. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology*, v.43, p.1359-1363, 1995.
- VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.

CAPÍTULO 2

Artigo 2. Avaliação morfológica de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol

Recebido pela Revista Brasileira de Ciência Veterinária

INSS: 1413-0130

Artigo 2. Avaliação morfológica de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol.

Resumo

O trabalho teve como objetivo avaliar a morfologia de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS submetidos ao teste de termo-resistência. Além de comparar a eficiência do corante azul de bromofenol com o corante clássico de eosina-nigrosina na avaliação morfológica do sêmen caprino fresco e descongelado. Foram utilizados 04 bodes. Os diluentes empregados foram: ACP-101 (+ 2,5% gema ovo + 7% glicerol) e TRIS (+ 20% gema ovo + 6,8% glicerol). O sêmen foi coletado por meio de vagina artificial e, avaliado quanto a: volume, concentração, motilidade massal, porcentagem de espermatozóides móveis, motilidade individual progressiva, porcentagem de espermatozóides vivos e mortos e, morfologia espermática. Cada ejaculado foi dividido e diluído nos tratamentos experimentais ACP-101 e TRIS. As amostras foram refrigeradas até 4°C, glicerolizadas, envasadas em palhetas, congeladas em vapores de nitrogênio (-100°C), armazenadas em botijão criogênico (-196°C) e após 30 dias, descongeladas. A morfologia espermática foi avaliada, aos 5 e 120 minutos pós-descongelação, por meio de esfregaços de corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. Os parâmetros morfológicos avaliados foram: espermatozóides normais (N), alterações de cabeça (AC), de peça intermediária (API), de flagelo (AF), gota citoplasmática proximal (GCP), gota citoplasmática distal (GCD), e cabeça destacada (CD). Os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey com 5% de probabilidade. Não existiu diferença significativa na observação de N, GCD e CD entre diluentes, corantes e suas interações após 5 minutos do teste de termo-resistência. A constatação de AC foi significativamente inferior nos espermatozóides do tratamento ACP-AB, quando comparadas ao tratamento TRIS-AB. Após 120 minutos a quantificação de N foi influenciada significativamente pelo diluente, tendo o TRIS apresentado resultados superiores. As AC foram influenciadas pelo diluente quando os esfregaços foram corados pela eosina-nigrosina, tendo o ACP-101 apresentado valores superiores. O período de incubação de 120 minutos a 37°C afetou a morfologia espermática, aumentando as porcentagens de AC, principalmente relacionadas a alterações acrossomais, em todos os tratamentos.

Conclui-se que o meio diluente à base de TRIS promoveu uma maior proteção quanto às crioinjúrias em espermatozóides caprinos congelados. O corante azul de bromofenol demonstrou ser eficiente na avaliação do sêmen caprino fresco e pós-descongelamento.

Palavras-chave: caprinos; espermatozóides; água de coco em pó; TRIS; eosina-nigrosina; azul de bromofenol.

Article 2. Morphologic evaluation of goat spermatozoa diluted and frozen in media based on powder coconut water (PCW-101) or TRIS, stained by eosin-nigrosin and bromophenol blue.

Abstract

The aims of the work were: to evaluate “in vitro” the goat semen frozen in diluents media based on powder coconut water (PCW-101) and TRIS (hydroxymethyl amino methane), compare the bromophenol blue stain efficiency with the classic stain eosin-nigrosin on the morphologic evaluation of fresh and post-thawing goat semen submitted to thermo resistance test. Four goats were utilized. The employed diluents were: PCW-101 (+ 2.5% egg yolk + 7% glycerol) and TRIS (+ 20% egg yolk + 6.8% glycerol). The ejaculateds were collected using artificial vagina, assessed for: volume, concentration, mass motility, percentage of motile spermatozoa, and progressive individual motility. Right away, each ejaculate was divided into two aliquots and diluted into the experimental treatments PCW-101 and TRIS. The samples were refrigerated to 4°C, glycerolated, loaded into straws, frozen into nitrogen vapors (-100°C), stored into cryogenic tank (-196°C) and thawed after 30 days. Spermatic morphology was evaluated at 5 and 120 minutes post-thaw, through semen smears stained by eosin-nigrosin (EN) and bromophenol blue (BB). The morphologic parameters evaluated were: normal spermatozoa (N), head alteration (HA), intermediary piece alteration (IPA), tail alteration (TA), proximal cytoplasmic drop (PCD), distal cytoplasmic drop (DCD), and detached head (DH). The data were analyzed using ANOVA and Tukey tests with 5% of probability (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Independently of the kinetic variable studied, the treatment PCW x RL showed significantly inferior to the other during the thermo resistance test. The media based on TRIS showed kinetic results significantly superior to PCW-101, to the 60 and 120 min. The spermatozoa diluted and frozen on TRIS didn't suffer the redilution solution influence post-thaw. There wasn't significant difference in the observation of N between media staining and their interactions after 5 minutes of thermo resistance test. After 120, the N was significantly influenced by media, where the TRIS presented better results. The incubation period of 120 minutes at 37°C affect the spermatic morphology, increasing the HA percentages into all treatments. Kinetic parameters, after five minutes incubated at 37°C, of goat spermatozoa diluted and frozen on media based on PCW-101 showed the potentiality of this media on

buck seminal cryopreservation. The media based on TRIS promoted better protection from the cryoinjuries on frozen goat spermatozoa. Bromophenol blue staining was efficient on the fresh and post-thaw goat semen evaluation.

Keywords: goat; spermatozoa; powder coconut water; TRIS; eosin-nigrosin; bromophenol blue.

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS DILUÍDOS E CONGELADOS EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-101) OU TRIS, CORADOS POR EOSINA-NIGROSINA E AZUL DE BROMOFENOL

[Morphologic evaluation of goat spermatozoa diluted and frozen in media based on powder coconut water (PCW-101) or TRIS, stained by eosin-nigrosin and bromophenol blue]

Rodrigo Vasconcelos de Oliveira^{*}; José Ferreira Nunes^{*}; Cristiane Clemente de Mello Salgueiro^{*}; José Maurício Maciel Cavalcante^{*}; Oscar Oliveira Brasil^{}; Jullio da Costa Batista Parente^{**}; Raphael Fernando Braga Gonçalves^{**}; Carlos André da Penha Mendes Batista^{**}; Arlindo Alencar de Araripe Moura^{***}; Airton Alencar de Araújo^{*}**

^{*} Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará
Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60.740-000, Fortaleza-CE
e-mail: rodrigovetbio123@yahoo.com.br

^{**} Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará

^{***} Programa de Pós-graduação em Zootecnia Universidade Federal do Ceará

Resumo

O trabalho teve como objetivo avaliar a morfologia de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS submetidos ao teste de termo-resistência. Além de comparar a eficiência do corante azul de bromofenol com o corante clássico de eosina-nigrosina na avaliação morfológica do sêmen caprino fresco e descongelado. Foram utilizados 04 bodes. Os diluentes empregados foram: ACP-101 (+ 2,5% gema ovo + 7% glicerol) e TRIS (+ 20% gema ovo + 6,8% glicerol). O sêmen foi coletado por meio de vagina artificial e, avaliado quanto a: volume, concentração, motilidade massal, porcentagem de espermatozóides móveis, motilidade individual progressiva, porcentagem de espermatozóides vivos e mortos e, morfologia espermática. Cada ejaculado foi dividido e diluído nos tratamentos experimentais ACP-101 e TRIS. As amostras foram refrigeradas até 4°C, glicerolizadas, envasadas em palhetas, congeladas em vapores de nitrogênio (-100°C), armazenadas em botijão criogênico (-196°C) e após 30 dias, descongeladas. A morfologia espermática foi avaliada, aos 5 e 120 minutos

pós-descongelamento, por meio de esfregaços de corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. Os parâmetros morfológicos avaliados foram: espermatozoides normais (N), alterações de cabeça (AC), de peça intermediária (API), de flagelo (AF), gota citoplasmática proximal (GCP), gota citoplasmática distal (GCD), e cabeça destacada (CD). Os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey com 5% de probabilidade. Não existiu diferença significativa na observação de N, GCD e CD entre diluentes, corantes e suas interações após 5 minutos do teste de termo-resistência. A constatação de AC foi significativamente inferior nos espermatozoides do tratamento ACP-AB, quando comparadas ao tratamento TRIS-AB. Após 120 minutos a quantificação de N foi influenciada significativamente pelo diluente, tendo o TRIS apresentado resultados superiores. As AC foram influenciadas pelo diluente quando os esfregaços foram corados pela eosina-nigrosina, tendo o ACP-101 apresentado valores superiores. O período de incubação de 120 minutos a 37°C afetou a morfologia espermática, aumentando as porcentagens de AC, principalmente relacionadas a alterações acrossomais, em todos os tratamentos. Conclui-se que o meio diluente à base de TRIS promoveu uma maior proteção quanto às crioinjúrias em espermatozoides caprinos congelados. O corante azul de bromofenol demonstrou ser eficiente na avaliação do sêmen caprino fresco e pós-descongelamento.

Palavras-chave: caprinos; espermatozoides; água de coco em pó; TRIS; eosina-nigrosina; azul de bromofenol.

Abstract

The aims of the work were: to evaluate “in vitro” the goat semen frozen in diluents media based on powder coconut water (PCW-101) and TRIS (hydroxymethyl amino methane), compare the bromophenol blue stain efficiency with the classic stain eosin-nigrosin on the morphologic evaluation of fresh and post-thawing goat semen submitted to thermo resistance test. Four goats were utilized. The employed diluents were: PCW-101 (+ 2.5% egg yolk + 7% glycerol) and TRIS (+ 20% egg yolk + 6.8% glycerol). The ejaculateds were collected using artificial vagina, assessed for: volume, concentration, mass motility, percentage of motile spermatozoa, and progressive individual motility. Right away, each ejaculate was divided into two aliquots and diluted into the experimental treatments PCW-101 and TRIS. The

samples were refrigerated to 4°C, glycerolated, loaded into straws, frozen into nitrogen vapors (-100°C), stored into cryogenic tank (-196°C) and thawed after 30 days. Spermatic morphology was evaluated at 5 and 120 minutes post-thaw, through semen smears stained by eosin-nigrosin (EN) and bromophenol blue (BB). The morphologic parameters evaluated were: normal spermatozoa (N), head alteration (HA), intermediary piece alteration (IPA), tail alteration (TA), proximal cytoplasmic drop (PCD), distal cytoplasmic drop (DCD), and detached head (DH). The data were analyzed using ANOVA and Tukey tests with 5% of probability (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Independently of the kinetic variable studied, the treatment PCW x RL showed significantly inferior to the other during the thermo resistance test. The media based on TRIS showed kinetic results significantly superior to PCW-101, to the 60 and 120 min. The spermatozoa diluted and frozen on TRIS didn't suffer the redilution solution influence post-thaw. There wasn't significant difference in the observation of N between media staining and their interactions after 5 minutes of thermo resistance test. After 120, the N was significantly influenced by media, where the TRIS presented better results. The incubation period of 120 minutes at 37°C affect the spermatic morphology, increasing the HA percentages into all treatments. Kinetic parameters, after five minutes incubated at 37°C, of goat spermatozoa diluted and frozen on media based on PCW-101 showed the potentiality of this media on buck seminal cryopreservation. The media based on TRIS promoted better protection from the cryoinjuries on frozen goat spermatozoa. Bromophenol blue staining was efficient on the fresh and post-thaw goat semen evaluation.

Keywords: goat; spermatozoa; powder coconut water; TRIS; eosin-nigrosin; bromophenol blue.

Introdução

A avaliação morfológica pode ser avaliada por meio de preparação úmida e esfregãos corados (Bearden e Fuquay, 1992). Derivaux (1980) relata que as anormalidade espermáticas podem afetar, isolada ou simultaneamente, as diferentes regiões da cabeça, peça intermediária e cauda.

Existe uma correlação média entre a morfologia espermática, particularmente quando presentes alterações acrossomais (Foote, 2003; Chenoweth, 2005) e a

fertilidade, entretanto é variável, sendo influenciada pela metodologia empregada na avaliação (Rodriguez-Martinez, 2005).

A viabilidade espermática está relacionada com a integridade da membrana plasmática (Evans e Maxwell, 1990; Chemineau, 1991), que pode ser avaliada por meio de colorações vitais (Colas, 1980; Derivaux, 1980; Bearden e Fuquay, 1992). Dentre os corantes utilizados podem ser citados a eosina-nigrosina (Derivaux, 1980; Evans e Maxwell, 1990; Chemineau, 1991; Bearden e Fuquay, 1992), azul de tripan, (Bearden e Fuquay, 1992) e azul de bromofenol (Derivaux, 1980; Mies Filho, 1982; Medeiros, 2004).

Durante os processos de congelação-descongelação os espermatozóides são submetidos a condições desfavoráveis (Parks e Graham, 1992), e conseqüentemente, podem ocorrer danos à membrana plasmática e acrossoma (Watson, 1995).

O azul de bromofenol demonstrou ser um corante eficiente para avaliação do sêmen ovino (Medeiros, 2004), entretanto, existe uma carência de trabalhos relacionados a sua utilização para sêmen caprino.

Nesse sentido, este trabalho visa avaliar a morfologia de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meios diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS submetidos ao teste de termo-resistência. Além de comparar a eficiência do corante azul de bromofenol com o corante clássico de eosina-nigrosina na avaliação morfológica do sêmen caprino fresco e descongelado.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará, no município de Fortaleza, Ceará, com latitude 03°43' Sul e longitude 38°30' Oeste, com temperatura média anual de 27°C. Foram utilizados 04 bodes, dois da raça Saanen e dois da raça Boer. Os animais foram mantidos em confinamento, em baias individuais. A alimentação consistiu de feno de tifton (*Cynodon* sp.) e ração comercial com 18% PB e, sal mineral e água à vontade.

Preparação dos diluentes

O diluente à base de água de coco em pó, com pH 6,8 e 300 mOsm/Kg para sêmen caprino, o ACP-101, era constituído por: água de coco em pó acrescida de tampões, 100 ml de água destilada, 40 mg de gentamicina, 2,5% de gema de ovo e 7% de

glicerol. O diluente foi dividido em duas frações: “A” sem glicerol e “B” com 14% glicerol (Salgueiro *et al.*, 2003).

O diluente à base de TRIS, com pH 6,8 e 300 mOsm/Kg, era constituído por : 3,786 g de Tris, 2,11 g de ácido cítrico, 100 ml de água destilada, 40 mg de gentamicina, 1% de frutose, 20% de gema de ovo e 6,8% de glicerol. O diluente foi dividido em duas frações: “A” sem glicerol e “B” com 13,6% de glicerol (Singh *et al.*, 1995).

Coleta e processamento seminal

O sêmen foi coletado na presença de uma fêmea em cio induzido por uma injeção prévia, com 48 de antecedência ao procedimento, de Benzoato de Estradiol (Estrogin[®]), por meio de vagina artificial (IMV[®]) aquecida a 40-42 °C e lubrificada com glicerina. Está contida um cone de borracha, acoplado a um tubo coletor Falcon de 15 ml. A coleta de sêmen realizou-se duas vezes por semana perfazendo um total de 12 ejaculados por animal, totalizando 48 ejaculados. Após cada coleta, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 30°C enquanto se realizou a avaliação seminal.

O volume do ejaculado (ml) foi mensurado por meio da observação direta do tubo coletor graduado.

A avaliação de motilidade massal (MM) realizou-se por meio da avaliação de uma gota de 5µl de sêmen puro em lâmina, previamente aquecida a 37°C, sob aumento de 100x em microscópio de contraste de fase: sendo classificada de 0 a 5 (Chemineau *et al.*, 1991).

Para avaliação da porcentagem de espermatozóides móveis (PEM) e motilidade individual progressiva (MIP) (0-5) 10µl de sêmen puro foram diluídos em 500µl de solução fisiológica de NaCl a 0,9% mantida também no banho-maria a 30°C, sendo, logo após a homogeneização conduzida uma alíquota 10µl a uma lâmina, previamente aquecida a 37°C, sob aumento de 400x em microscópio de contraste de fase: sendo a PEM atribuída em valores de porcentagem e a MIP classificada de 0 a 5 (Chemineau *et al.*, 1991).

Após a avaliação da MM, PEM e MIP cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas iguais, sendo então acondicionadas em tubos de ensaio de 15 ml. Estas irão formar dois tratamentos experimentais: ACP-101 e TRIS, sendo submetidas a uma pré-diluição na taxa de 1:2 (sêmen:fração A diluente) (v/v), a 30°C.

A concentração espermática ($\times 10^9$ spz/ml) foi mensurada por meio do método de espectrofotometria, diluindo 10µl de sêmen puro em 4 ml de solução de formaldeído

a 0,1% (taxa de diluição 1:400 v/v) (Sorensen, 1982).

Para a avaliação da morfologia espermática e porcentagem de espermatozóides vivos e mortos foram confeccionados esfregaços de sêmen corados com eosina-nigrosina (Colas, 1980) e azul de bromofenol (Derivaux, 1980; Medeiros, 2004). Para tanto, uma gota de 30 μ l do corante foi acondicionada em lâmina, previamente aquecida a 37°C e, com um pequeno bastão de plástico maciço com ponta levemente umedecida com sêmen puro, procedeu-se a mistura com o corante, e após, um repouso de 10 segundos, utilizando-se uma lamínula, previamente aquecida a 37°C, formando um ângulo de 30° com a lamina, a gota contendo sêmen e corante foi tocada e estendida até a extremidade oposta, formando o esfregaço corado. Estes foram secos em chapa aquecida a 37°C e então avaliados em microscopia de contraste de fase sob aumento de 1000x, em objetiva de imersão, quanto à porcentagem de espermatozóides vivos, mortos, normais e alterações de cabeça, peça intermediária, flagelo, gotas citoplasmáticas proximal e distal, e cabeça destacada.

Após a mensuração da concentração espermática de cada ejaculado, foi calculada a quantidade das frações A e B de cada diluente. Todos os grupos foram submetidos à segunda diluição a 30°C, pela adição do volume restante da fração “A” de cada diluidor. Posteriormente, as amostras de sêmen diluído, acondicionadas em tubos de ensaio de 15 ml vedados com tampa de borracha, foram levadas a um recipiente plástico contendo 200 ml de água a 30 °C. Sendo, então, o conjunto refrigerado em um freezer horizontal (Prosdócimo[®]), durante 120 minutos, até alcançar 4°C a uma velocidade média de refrigeração de 0,22°C/minuto. A curva de refrigeração foi monitorada com um termômetro digital (HEADterm 200[®]).

Uma vez alcançando 4°C, realizou-se a terceira diluição adicionando-se o volume da fração “B”, previamente calculado, de cada diluente em três etapas, com intervalos de cinco minutos, até alcançar uma concentração final de 400x10⁶ sptz/ml, com mais 5 minutos de tempo de equilíbrio.

O sêmen diluído e resfriado a 4°C, de todos os grupos, foi envasado em palhetas francesas de 0,25 ml (contendo cada uma 100x10⁶ espermatozóides), previamente identificadas e refrigeradas a 4°C. O envase foi realizado em uma estante dentro do freezer horizontal.

As palhetas, dos tratamentos ACP-101 e TRIS, com sêmen diluído e refrigerado 4°C, foram colocadas em rampa de congelação, distante 3,5 cm do nível do nitrogênio líquido (N₂L), onde se congelaram nos vapores (-100°C) por um período de dez minutos, posteriormente

sendo submersas em N₂L, a -196°C, acondicionadas em globetes fixados em racks identificadas, sendo então armazenadas em botijão criogênico.

Decorridos 30 dias após a congelação, foram retiradas do botijão criogênico amostras de palhetas para descongelação. As palhetas foram imersas em banho-maria a 37°C durante 30 segundos. Descongeladas, as amostras, foram acondicionadas em tubos Eppendorf®, e mantidas a 37 °C por 120 minutos, para realização do teste de termo-resistência, (Chemineau *et al.*, 1991; CBRA, 1998).

A morfologia espermática foi avaliada, aos 5 e 120 minutos pós-descongelação, sob microscopia de contraste de fase, em aumento de 1000X com objetiva de imersão, analisando lâminas de esfregaços de sêmen pós-descongelação, corados por eosina-nigrosina (Colas, 1980) e azul de bromofenol (Derivaux, 1980; Medeiros, 2004), como citado anteriormente.

Para a análise estatística os ejaculados foram considerados repetições para as variáveis estudadas. Depois de comprovar a distribuição normal das variáveis e de aplicar as transformações necessárias, foram realizadas as seguintes provas:

Análise de variância de duas vias, tomando-se como efeito fixo: diluente, corante e diluente x corante, e como efeitos variáveis: espermatozoides vivos e mortos, N, AC, API, AF, GCP, GCD e CD. Para se obter diferenças significativas entre as médias nos casos em que a análise de variância revelou efeito significativo foi utilizado o teste t de Student para e o teste de Tukey para a comparação múltipla de médias para o sêmen fresco e pós-descongelação, respectivamente. Os dados são apresentados como médias ± desvio padrão e se considerou significativa uma diferença de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Os parâmetros do sêmen fresco dos quatro bodes avaliados foram: volume, concentração espermática (Conc. Sptz), motilidade massal (MM), porcentagem de espermatozoides móveis (PEM) e motilidade individual progressiva (MIP) (Tabela 1). Todos os animais possuíam características seminais normais para a espécie, de acordo com o Evans e Maxwell (1990), Chemineau *et al.* (1991) e CBRA (1998).

Tabela 1. Parâmetros (média ± dp) do sêmen fresco de quatro bodes.

Bode	Volume	Conc. Sptz	MM (0-5)	PEM (%)	MIP (0-5)
------	--------	------------	----------	---------	-----------

	(ml)	(10 ⁹ /ml)			
1	0,78 ± 0,21	5,41 ± 0,54	3,83 ± 0,54	81,25 ± 6,44	3,71 ± 0,45
2	0,74 ± 0,23	5,53 ± 0,42	3,79 ± 0,45	82,50 ± 3,37	3,50 ± 0,37
4	0,57 ± 0,11	5,47 ± 0,40	4,08 ± 0,47	87,92 ± 3,96	4,00 ± 0,43
5	0,69 ± 0,28	4,35 ± 0,88	3,42 ± 0,36	82,08 ± 3,96	3,71 ± 0,45
Total	0,69 ± 0,23	5,19 ± 0,75	3,78 ± 0,50	83,44 ± 5,17	3,73 ± 0,45

p>0,05.

Os resultados obtidos com a avaliação da integridade de membrana e morfologia de espermatozoides caprinos frescos, em esfregaços corados com eosina-nigrosina e azul de bromofenol, confeccionados logo após a coleta por vagina artificial estão representados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Integridade de membrana de espermatozoides caprinos frescos, corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), logo após a coleta por vagina artificial.

Corante	Vivos (não corados)	Mortos (corados)
EN	76,65±7,83	23,33±7,77
AB	76,21±0,74	23,79±8,88

p>0,05.

Não houve diferença significativa em relação à avaliação de integridade de membrana (vivos e mortos), espermatozoides normais e alterações de peça intermediária. Entretanto, as quantificações de alterações de cabeça, gota citoplasmática distal e cabeça destacada foram significativamente superiores nos esfregaços corados com eosina-nigrosina. Os esfregaços corados com azul de bromofenol possuíram maior percentual de alterações de flagelo. O total de alterações morfológicas no sêmen fresco estava inferior ao limite de 15%, delimitado pelo CBRA (1998). A interação da maior sensibilidade na visualização das alterações de cabeça nos espermatozoides corados pela solução de eosina-nigrosina com a ordem de importância (AC>DPI>GCP>GCD>AF) relacionada à classificação das alterações, pode ter promovido a diferença significativa relacionada

à observação de alterações de flagelo entre os corantes.

A porcentagem espermatozoides mortos (corados), tanto pela eosina-nigrosina, como pelo azul de bromofenol foram superiores aos achados de Barkawi *et al.* (2005), Nur *et al.* (2005) e Gubartallah *et al.* (2004), que encontraram valores de 9,2%, 12,7% e 15,49%, respectivamente, e inferiores aos 22% observados por Zamiri e Heidari (2006). O percentual do total de alterações morfológicas no sêmen fresco estava inferior ao limite de 15% delimitado pelo CBRA (1998) e semelhantes aos resultados obtidos por Karagiannidis *et al.* (2000), Soylu *et al.* (2003), Gubartallah *et al.* (2004), Barkawi *et al.* (2005), e Zamiri e Heidari (2006), que observaram percentuais de defeitos totais no sêmen caprino fresco corado por eosina-nigrosina de 8,79; 9,10; 8,56; 13,5; e 9,85 %, respectivamente.

Tabela 3. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos frescos, corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), logo após a coleta por vagina artificial.

Corante	N	AC	API	AF	GCP	GCD	CD
EN	91,29±4,41	1,69±1,49 ^a	1,35±1,38	4,48±3,52 ^b	0,08±0,28	0,44±0,80 ^a	0,60±0,74 ^a
AB	90,29±4,46	0,67±0,97 ^b	1,42±2,36	7,35±3,61 ^a	0,13±0,49	0,00±0,00 ^b	0,13±0,33 ^b

Letras minúsculas entre linhas ($p < 0,05$).

N = normais; AC = alteração de cabeça; API = alteração de peça intermediária; AF = alteração de flagelo; GCP = gota citoplasmática proximal; GCD = gota citoplasmática distal; CD = cabeça destacada

Os dados obtidos com a avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, por meio de esfregaços corados com eosina-nigrosina e azul de bromofenol, após 5 minutos do teste de termo-resistência estão ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco (ACP-101) e TRIS, por meio de esfregaços corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), após 5 minutos do teste de termo-resistência.

Tratamento	N	AC	API	AF	GCP	GCD	CD
ACP-EN	64,54±8,16	27,13±8,28 ^{ab}	1,06±1,19 ^b	5,85±3,41 ^b	0,10±0,31 ^b	0,29±0,80	0,96± 1,01
ACP-AB	62,96±9,09	24,92±8,24 ^b	2,35±2,28 ^a	8,38±4,45 ^a	0,31±0,55 ^a	0,27±0,82	0,77±0,99
TRIS-EN	61,79±9,80	31,25±9,72 ^a	0,92±1,16 ^b	5,35±3,33 ^b	0,00±0,00 ^b	0,04±0,20	0,99±0,89
TRIS-AB	60,94±7,48	31,48±7,39 ^a	1,23±1,17 ^b	5,00±3,89 ^b	0,21±0,46 ^b	0,42±0,99	0,69±0,90

Letras minúsculas entre linhas ($p < 0,05$).

N = normais; AC = alteração de cabeça; API = alteração de peça intermediária; AF = alteração de flagelo; GCP = gota citoplasmática proximal; GCD = gota citoplasmática distal; CD = cabeça destacada.

Não existiu diferença significativa na porcentagem de espermatozoides normais, gota citoplasmática distal e cabeça destacada entre diluentes, corantes e suas interações. A identificação das alterações de cabeça foi significativamente inferior nos espermatozoides do tratamento ACP-AB, quando comparadas ao tratamento TRIS-AB. Ainda, no tratamento ACP-AB houve observações de alterações de peça intermediária, flagelo e gota citoplasmática proximal superiores aos tratamentos ACP-EN e TRIS-AB.

Os dados oriundos da avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelado em meios à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, por meio de esfregaços corados com eosina-nigrosina e azul de bromofenol, após 120 minutos do teste de termo-resistência estão ilustrados na Tabela 5.

Tabela 5. Avaliação morfológica de espermatozóides caprinos diluídos e congelado em meios à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, por meio de esfregaços corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), após 120 minutos do teste de termo-resistência.

Tratamento	N	AC	API	AF	GCP	GCD	CD
ACP-EN	47,60±7,70 ^b	44,04±9,84 ^a	0,92±1,50 ^{ab}	6,10±4,42 ^b	0,06±0,24	0,17± 0,63	0,94± 1,24
ACP-AB	49,79±9,38 ^{bc}	38,69±8,36 ^b	1,52±1,25 ^a	8,94±4,54 ^a	0,15± 0,41	0,27± 0,82	0,63± 0,91
TRIS-EN	56,73±6,66 ^a	37,13±6,87 ^b	0,69±1,03 ^b	4,90±4,16 ^b	0,02± 0,14	0,13± 0,61	0,42± 0,65
TRIS-AB	52,88±9,22 ^{ac}	40,29±8,64 ^{ab}	0,92±1,07 ^{ab}	4,67±3,58 ^b	0,10± 0,37	0,27± 0,79	0,83± 1,08

Letras minúsculas entre linhas ($p < 0,05$).

N = normais; AC = alteração de cabeça; API = alteração de peça intermediária; AF = alteração de flagelo; GCP = gota citoplasmática proximal; GCD = gota citoplasmática distal; CD = cabeça destacada.

Não foi observado efeito do corante sobre as constatações de alterações morfológicas nos espermatozóides diluídos e congelados no meio diluente a base de TRIS. As alterações relacionadas às gotas citoplasmáticas proximal e distal e à cabeça destacada não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

Após 120 minutos do teste de termo-resistência, a porcentagem de espermatozóides normais foi influenciada significativamente pelo diluente, tendo o meio diluente à base de TRIS apresentado resultados superiores.

As observações de alterações de cabeça foram influenciadas pelo diluente quando os esfregaços foram corados pela eosina-nigrosina, tendo o ACP-101 apresentado valores superiores. A quantificação das alterações de flagelo foram significativamente superiores no tratamento ACP-AB. Entretanto, Salgueiro (2003), avaliando *in vitro* espermatozóides caprinos congelado-descongelados em meio diluente à base de água de coco *in natura* e TRIS-gema-glicerol, não observou diferenças significativas relacionadas às alterações morfológicas.

As principais alterações morfológicas após descongelação do sêmen constatadas foram relacionadas às alterações de cabeça e flagelo. Observações semelhantes foram relatadas por Singh *et al.* (1995) em espermatozóides caprinos diluídos e congelados-descongelados em diluente à base de TRIS-gema-glicerol. Hidalgo *et al.* (2006), Azeredo *et al.* (2001), e Ferrari e Barnabe (1999), observaram o efeito deletério da congelação do sêmen caprino sobre a porcentagem de defeitos acrossomais.

O período de incubação de 120 minutos a 37°C afetou a morfologia espermática, aumentando as porcentagens de alterações de cabeça em todos os tratamentos e alterações de cauda nos espermatozóides diluídos e congelados em ACP-101. Vale ressaltar que as principais alterações de cabeça observadas em todos os tratamentos, após a descongelação do sêmen, estavam relacionadas a defeitos no acrossoma.

A gema de ovo é um crioprotetor externo, acrescentado aos diluentes seminais, visando uma proteção não apenas relacionada aos danos oriundos do resfriamento (Evans e Maxwell, 1990; Purdy, 2005) como também as crioinjúrias produzidas pela etapa de congelação (Aboagla e Terada, 2004). Comparando-se os diluentes empregados no presente estudo, observa-se uma maior quantidade de gema no meio à base de TRIS, diferença que pode ter gerado sua maior proteção às crioinjúrias.

O corante azul de bromofenol promoveu uma melhor avaliação dos espermatozóides, principalmente no discernimento às alterações de cabeça, pois corou menos o fundo da lâmina, diminuindo os artefatos. Esta ressalva também foi relatada por Medeiros (2004), que ainda demonstrou a eficiência do corante após o armazenamento a temperatura ambiente (30°C) por 30 dias, o que facilita sua utilização em exames andrológicos a campo.

Vale ressaltar que os esfregaços corados com eosina-nigrosina, oriundos de sêmen caprino diluído e congelado em meio diluente à base de TRIS, apresentaram maior dificuldade na avaliação devido ao menor contraste entre o espermatozóide e o fundo da lâmina.

Conclusões

O meio diluente à base de TRIS promoveu uma maior proteção quanto às crioinjúrias em espermatozóides caprinos congelados.

O corante azul de bromofenol demonstrou ser eficiente na avaliação morfológica do sêmen caprino fresco e pós-descongelação.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio recebido pela CAPES, CNPq, FUNCAP e FUNECE. Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de Rodrigo Vasconcelos de Oliveira.

Referências Bibliográficas

- ABOAGLA, E.M.E., TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing steps of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, n.1160-1172, 2004.
- AZEREDO, G.A., ESPER, C.R., RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research*, v.41, p.257-263, 2001.
- BARKAWI, A.H., ELSAYED, E.H., ASHOUR, G., *et al.* Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Ruminant Research*, in press, 2005.
- BEARDEN, H.J., FUQUAY, J.W. *Applied Animal Reproduction*. New Jersey: Prentice-Hall, 1992. 478p.
- CBRA. *Manual para Exame e Avaliação de Sêmen Animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed., Belo Horizonte: CBRA, 1998, 79p.
- CHEMINEAU, P., CAGNIE, Y., GUERIN, Y., *et al.* *Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats*. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991, 222p.
- CHENOWETH, P.J. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, v.64, p.457-468, 2005.
- COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France II-étude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reproduction Nutrition and Development*, v.20, n.6, p.1789-1799, 1980.
- DERIVAUX, J. *Reprodução dos Animais Domésticos*. Zaragoza, Editora Acribia, 1980.
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Editora Acribia, S.A. Zaragoza, 1990, 192p.
- FERRARI, S., BARNABE, V.H. Effect of two kinds of diluents and two freezing methods on caprine semen quality. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.36, n.4, 1999.
- FOOTE, R.H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science*, n.75, p.114-139, 2003.
- GUBARTALLAH, K.A., AMEL, A.A., BAKHIET, O., *et al.* Comparative studies on reproductive performance of Nubian and Saanen Bucks under the climatic conditions of Khartoun. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.4, n.11, p.133-139, 2004.

- HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7.ed., Barueri-SP: Manole, 2004, 513p.
- HIDALGO, M., RODRIGUEZ, I., DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometric using the sperm class analyzer. *Theriogenology*, in press, 2006.
- KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, v.53, p.1285-1293, 2000.
- MEDEIROS, A.A. *Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para avaliação da morfologia do espermatozóide ovino*. Fortaleza, 2004. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 2004).
- MIES FILHO, A., DUTRA, J., GIRÃO, R.N. Congelamento do sêmen ovino na primavera. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.5, p.27-57, 1982.
- NUR, Z., DOGAN, I., GUNAY, U., *et al.* Relationship between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of Saanen goats. *Bull Veterinary Institute Pulawy*, v.49, p.183-187, 2005.
- PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. v. 32, p.209-222, 1992.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, (in press), 2005.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. *Anais... Palestras*.
- SALGUEIRO, C.C.M., NUNES, J.F., MATEOS-REX, E., *et al.* Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento por meio do Teste Hiposmótico. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.3, p.377-378, 2003.
- SINGH, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, v.43, p.1047-1053, 1995.
- SORENSEN, A.M. Jr. *Reprodução Animal. Princípios e Práticas*. Ed. McGraw-Hill. México.
- SOYLU, M.K., DOGAN, I., NUR, Z., *ET AL.* Evaluation of goat semen morphology after different staining methods. *Veteriner Fakulteri Dergesu*, Uludez Unisersitesi,

v.22, n1, 39-43, 2003.

ZAMIRI, M.J., HEIDARI, A.H. Reproductive characteristics of Raylini male goats of Kerman province in Iran. *Animal Reproduction Science*, v.96, p.176-185, 2006.

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

6. CONCLUSÕES

- Os efeitos das soluções de re-diluição sobre a cinética espermática são relacionados ao meio diluente utilizado na congelação do sêmen caprino.
- As soluções de re-diluição não influenciaram os parâmetros cinéticos em espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meio à base de TRIS.
- Os parâmetros cinéticos, após cinco minutos de incubação a 37°C, de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meio diluente à base de ACP-101 demonstram a potencialidade deste meio na criopreservação seminal de bodes, gerando perspectivas para o emprego deste meio com novos percentuais de gema de ovo.
- O meio diluente à base de TRIS promoveu uma maior proteção quanto às crioinjúrias em espermatozóides caprinos congelados.
- O corante azul de bromofenol demonstrou ser eficiente na avaliação do sêmen caprino fresco e descongelado.

7. PERSPECTIVAS

- Devido à possível influência da concentração de gema de ovo, nos resultados superiores pós-descongelamento obtidos com o diluente a base de TRIS *in vitro*, fazem-se necessários novos trabalhos avaliando concentrações de gema superiores a 2,5% no meio a base de água em pó.
- No intuito de se obter um diluidor seminal isento de produtos de origem animal, poderia ser analisada a adição ao meio à base de água de coco pó, em substituição a gema de ovo, fosfolípidios de origem vegetal, como a lecitina de soja.
- Posteriormente a otimização *in vitro* da criopreservação de sêmen de bodes em meio à base de água de coco em pó, deverão ser realizados estudos com a fertilidade após inseminações artificiais, vias cervical ou laparoscópica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOAGLA, E.M.E., TERADA, T. Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1245-1250, 2003.
- ABOAGLA, E.M.E., TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing steps of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, n.1160-1172, 2004.
- AMANN, R.P., KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, v.25, n.3, p.317-325, 2004.
- ARAUJO, I.S. *Utilização da água de coco e do leite glicosado como diluidor do sêmen ovino*. Fortaleza, 1990. 35p. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1990).
- ARAÚJO, A. A., NUNES, J.F. Utilização da água de coco "in natura" adicionada de gema de ovo como diluente do sêmen caprino. *Ciência Animal*, Fortaleza, v.1, p.39-49, 1991.
- AZEREDO, G.A., ESPER, C.R., RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research*, v.41, p.257-263, 2001.
- BAG, S., JOSHI, A., RAWAT, P.S., MITTAL, J.P. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in semi-arid tropical environment. *Small Ruminant Research*, v.43, p.23-29, 2003.
- BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal of Andrology*, v.21, p.1-7, 2000.
- BEARDEN, H.J., FUQUAY, J.W. *Applied Animal Reproduction*. New Jersey: Prentice-Hall, 1992. 478p.
- BITTENCOURT, R.F., RUFINO, A.L., SANTOS, A.D., *et al.* Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. *Ciência Animal Brasileira*, v.5, n.1, p.27-32, 2004.

- BITTENCOURT, R.F., RIBEIRO FILHO, A.L., ALVES, S.G.G., *et al.* O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.7, n.1, p.27-37, 2006.
- BLUME, H., MARQUES Jr., A.P.V. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.18, p.97-104, 1994.
- BOYERS, S.P., DAVIS, R.O., KATZ, D.F. Automated semen analysis. *Current. Prob. Obstetr. Gynecol.*, 12, 167-200, 1989.
- BRITO, L.F.C., BARTH, A.D., BILODEAU-GOESSEL, L., *et al.* Composition of methods to evaluate the plasmalema of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, v.60, 1539-1551, 2003.
- CABRERA, F., GONZALEZ, F., BATISTA, M., *et al.* The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, p.191-195, 2005.
- CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R, UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59, 743 – 751, 2003.
- CBRA. *Manual para Exame e Avaliação de Sêmen Animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed., Belo Horizonte: CBRA, 1998, 79p.
- CHAUHAN, M.S., ANAND, S.R. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology*, v.34, p.1003-1013, 1990.
- CHEMINEAU, P., CAGNIE, Y., GUERIN, Y., *et al.* *Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats*. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991, 222p.
- CHENOWETH, P.J. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, v.64, p.457-468, 2005.
- CHOE, C.H., KIM, J.G., CHO, S.R, *et al.* Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.55-60, 2000.
- CORTEEL, J.M. Effet du lavage sur la conservation des spermatozoïdes de bouc a basse température. *Annual Biologic Animal Biochemistry Biophysic*, v.15, p.525-528, 1975.
- CORTEEL, J.M.; LÉBOUF, B. Evolution technico-économique de l'insémination artificielle caprine. *Rev. Elev. Insemin.*, v.237, p.171-191, 1990.

- CORTEEL, J.M. Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation. In: V INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT, New Delhi, 2, p.290, 1992.
- COX, J.F., ALFARO, V., MONTENEGRO, V., *et al.* Computer-assisted analysis on sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, v.66, p.860-867, 2006.
- CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, v.5, p.46-52, 2000.
- DARIN-BENNET, A., WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, v.14, 466-470, 1977.
- DAS, K.K., RAJKONWAR, C.K. Effect on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. *International Journal of Animal Science*, v.10, p.127-128, 1995.
- DEKA, B.B., RAO, A.R. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. *Indian Veterinary Journal*, v.64, p.591-594, 1987.
- DERIVAUX, J. *Reprodução dos Animais Domésticos*. Zaragoza, Editora Acribia, 1980.
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editora Acribia, S.A. Zaragoza, 1990, 192p.
- FARREL, P.B., PRESIW, G.A., BROCKETT, C.G., *et al.* Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v.49, p.871-979, 1998.
- FOOTE, R.H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science*, n.75, p.114-139, 2003.
- FRASER, A.F. A technique for freezing goat semen and results of a small breeding trial. *The Canadian Veterinary Journal*, v.3, n.5, 1962.
- FREITAS, V.J.F. *Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina corionica (HCG), inseminadas artificialmente*. Fortaleza, 1988. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 1988).
- FUJIMURA, M., OKUNO, M. Requirements of fixed end for spontaneous beating in flagela. *The Journal of Experimental Biology*, v.209, p.1336-1343, 2006.
- GUBARTALLAH, K.A., AMEL, A.A., BAKHIET, O., *et al.* Comparative studies on reproductive performance of Nubian and Saanen Bucks under the climatic conditions of Khartoun. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.4, n.11, p.133-139, 2004.

- HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7.ed., Barueri-SP: Manole, 2004, 513p.
- HOLT, W.V., VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, v. 127, p.527-535, 2004.
- HOPKINS, S.M., EVANS, L.E. In: McDONALD, L.E. *Endocrinologia Veterinária y Reproducción*. 4 Ed. Interamericana. México, 1991.
- HUNTER, R.H.F. *Fisiología y Tecnología de la Reproducción de la Hembra de los Animales Domésticos*. Ed. Acribia. Zaragoza, 1982.
- KATO, S., SHIBUKAWA, T., HASAYAMA, H., *et al.* Timing of shedding and desintegration of citoplasmic droplets from boar and goat spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, n.42, p. 237-241, 1996.
- KRAUSE, W., VIETHEN, G. Quality assessment of computer assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. *Andrologia*, v.31, p.125-129, 1999.
- KUNDU, C.N., DAS, K., MAJUMBER, G.C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology*, v.41, p.21-27, 2001.
- LEBOEUF, B., RESTALL, B., SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.
- MACHADO, R. Inseminação artificial com sêmen congelado em caprinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.3, p.265-276, 1991.
- MACK, S., WOLF, D., TASH, J. Quantization of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. *Biology of Reproduction*, v.38, p.270-281, 1988.
- MORTIMER, S.T. *CASA – Practical Aspects*. p.515-524, 2000.
- MATEOX-REX, E.; AGUILLAR, C.G.C. Técnicas de control de la reproducción en ganado caprino. In: *Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal*. Colección Estudios. Ed. S. Pub. U. Castilla la Mancha, Cuenca, 32, 9, 183-202, 1996.
- MEDEIROS, A.A. *Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para avaliação da morfologia do espermatozóide ovino*. Fortaleza, 2004. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 2004).

- MIES FILHO, A., DUTRA, J., GIRÃO, R.N. Congelação do sêmen ovino na primavera. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.5, p.27-57, 1982.
- MONTEZUMA Jr., P., VIANA NETO, C., NUNES, J.F. Água de coco como diluidor de sêmen de cães In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DA UECE, *Anais...* 1994.
- NUNES, J. F., CORTEEL, J.M., COMBARBOUS, Y. Study of the involvement of seminal plasma in the seasonal variation of goat spermatozoa motility. In: III INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 1982, Tucson. *Proceedings...* Tucson, Arizona, p.467-480, 1982.
- NUNES, J.F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: SIMPÓSIO DA CAPRINOCULTURA DO ESTADO DO RIO, 1986, Niterói. *Anais...* Niterói.
- NUNES, J.F. Coconut water as diluent for goat semen. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS, 1987, Brasília. *Anais...* Brasília.
- NUNES, J. F. COMBARNOUS, Y., PRISCILA, L. Utilisation d'une substance ativa "JYP" presents dans l'eau de coco pour la conservation "in vitro" et la fertilité dès spermatozoides de mammifères. S.N.: 1994
- NUNES, J. F., COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluente do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza.
- NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos. *Revista de Ciências Agrárias*. Belém, n.43, 2005. Suplemento.
- NUR, Z., DOGAN, I., GUNAY, U., *et al.* Relationship between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of Saanen goats. *Bull Veterinary Institute Pulawy*, v.49, p.183-187, 2005.
- OYEYEMI, M.O., ADETUNJI, V.O., OLOBUKOLA, O.O. Effects of different planes of meat offals and soybean meal on the morphological characteristics of West African Dwarf Bucks. *Veterinary Archives*, v.76, p.159-165, 2006.
- PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. v. 32, p.209-222, 1992.
- PESCH, S., BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, v.37, p. 597-612, 2006.

- PÉREZ, B., MATEOS, E. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata e Malaguena breeds. *Small Ruminant Research*, v.23, p.23-28, 1996.
- PINTADO, B., FUENTE, J., ROLDAN, E.R.S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoeschst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.118, p.145-152, 2000.
- PURDY, P.H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.93, p.114-123, 1996.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, (in press), 2005.
- RITAR, A.J., SALAMON, S. Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angorá goat. *Australian Journal of Biological Science*, v.35, p.305-312, 1982.
- RITAR, A.J., BALL, P.D., O'MAY, P.J. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction Fertility and Development*, v.2, p.27-34, 1990.
- ROCA, J., CARRIZORA, J.A., CAMPOS, I., *et al.* Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina spermatozoa diluted in TRIS-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research*, v.25, p.147-153, 1997.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. *Anais... Palestras*.
- ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of goat. *Nature*, v. 159, p.318-319, 1957.
- ROYERE, D., BARTHELEMY, C., HAMAMAH, S. Cryopreservation of spermatozoa: a review. *Human Reproduction Update*, v.2, p.553-559, 1996.
- SALAMON, S., RITAR, A.J. Deep freezing of Angorá goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Australian Journal Biological Science*, v.35, p.293-303, 1982.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, v.38, p.1-36, 1995.

- SALGUEIRO, C.C.M. *Evaluación de diferentes diluyentes en la congelación del semen caprino*. Madrid, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias da Universidad Complutense de Madrid - UCM, 2003).
- SALGUEIRO, C.C.M., NUNES, J.F., MATEOS-REX, E., et al. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do Teste Hiposmótico. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.3, p.377-378, 2003.
- SALLES, M.G.F. *Água de coco (Cocos nucifera L.) "in natura" e na forma de gel e estabilizada como diluidor do sêmen caprino*. Porto Alegre, 1989. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRS, 1989).
- SILVA, P.F.N., GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.
- SINGH, M.P., SINHA, A.K., SINGH, B.K. Effect of cyoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, v.43, p.1047-1053, 1995.
- SMITH, A.H., POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, v.166, p.668-671, 1950.
- SOUZA, A.F., GUERRA, M.M.P., COLETO, Z.F., et al. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.43, n.3, p.324-336, 2006.
- SOYLU, M.K., DOGAN, I., NUR, Z., ET AL. Evaluation of goat semen morphology after different staining methods. *Veteriner Fakulteri Dergesu*, Uludez Unisersitesi, v.22, n1, 39-43, 2003.
- SPRECHER, D.J., COE, P.H. Differences in Bull spermiograms using eosin-nigrosin stain, feulgen stain, and phase contrast microscopy methods. *Theriogenology*, v.45, p.757-764, 1996.
- TARDIF, A.L., FARREL, P.B., TROUERN-TREND, V., et al. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.1606-1612, 1997.
- THUNDATHIL, J., PASZ, A.T., BARTH, A.D., et al. The use of in vitro techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. *Animal Reproduction Science*, v.65, p.181-192, 2001.

- TONIOLLI, R., MESQUITA, S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.14, p.249-254, 1990.
- TULI, R.K., HOLTZ, W. Effect of glicerolization procedure and removal of seminal plasma on pos-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.42, p.547-555, 1994.
- TULI, R.K., HOLTZ, W. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology*, v.43, p.1359-1363, 1995.
- VÁZQUEZ, I. Características morfológicas del semen. In: CURSO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL. CIT/INIA. Madri. Espanha. 2003.
- VERTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
- VIANA, A.K.S., CHALHOUB, M., FILHO, A.L.B., *et al.* Avaliação in vitro do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. *Ciência Animal Brasileira*, v.7, n.1, 67-76, 2006.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.62, p.483-492, 1981.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v.7, p.871-891, 1995.