



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO: EFEITO DE  
DIFERENTES PALHETAS, TAXAS DE DESCONGELAÇÃO E  
CRIOPROTETORES**

FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA

Médico Veterinário

MOSSORÓ – RN – BRASIL

Dezembro – 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO: EFEITO DE  
DIFERENTES PALHETAS, TAXAS DE DESCONGELAÇÃO E  
CRIOPROTETORES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva

MOSSORÓ – RN – BRASIL

Dezembro – 2009

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA**

B575c Bezerra, Francisco Silvestre Brilhante.

Criopreservação do sêmen caprino: efeito de diferentes palhetas, taxas de descongelação e crioprotetores. / Francisco Silvestre Brilhante Bezerra. -- Mossoró, 2009.

93f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal área de concentração Produção e Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Orientador: Prof. Dr. Sc. Alexandre Rodrigues Silva.

1.Criopreservação. 2.Capacidade da palheta.  
3.Dimetilformamida. 4.Sêmen caprino. 5.Taxa de descongelação. I.Título.

CDD: 636.39

Bibliotecária: Marilene Santos de Araújo  
CRB/5 1013

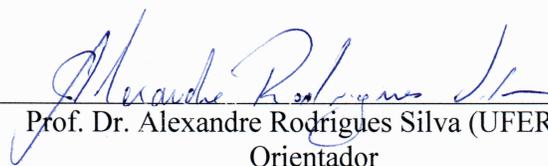
FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO: EFEITO DE  
DIFERENTES PALHETAS, TAXAS DE DESCONGELAÇÃO E  
CRIOPROTETORES**

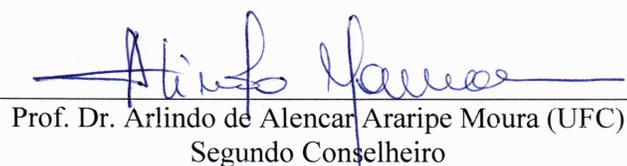
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do  
Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte  
das exigências para a obtenção do título de Mestre em  
Ciência Animal.

APROVADA EM 17/12/2009

**BANCA EXAMINADORA:**

  
Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva (UFERSA)  
Orientador

  
Profa. Dra. Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte (UFERSA)  
Primeira Conselheira

  
Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura (UFC)  
Segundo Conselheiro

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA** – Nascido no Município de Mossoró-RN no dia 02/05/1985, filho de José Simão Bezerra e Antonia Alves Brilhante Bezerra, concluiu o ensino médio e fundamental no Colégio Pequeno Príncipe. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2007.2, onde foi monitor da disciplina de Diagnóstico por Imagem e estagiário do Laboratório de Patologia Veterinária pelo período de dois anos. Durante a graduação desenvolveu trabalhos com *Trypanosoma vivax* e, em 2007, ganhou o 9º Prêmio Pesquisa Clínica Schering-Plough, na categoria estudante. Em janeiro 2008 foi selecionado pelo Programa em Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA. Em agosto do mesmo ano tornou-se docente da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró (FACENE/RN) lecionando a disciplina de Patologia Geral e, em 2009.1, assumiu também as disciplinas de Saúde Ambiental e Citologia para o curso de enfermagem. Em setembro de 2008 foi aprovado em concurso para professor substituto das disciplinas de Citologia para os cursos de Zootecnia e Medicina Veterinária e Ornitopatologia no curso de Medicina Veterinária junto ao Departamento de Ciências Animais na Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), no qual, em 2009 ministrou também as disciplinas de Biologia Celular para os cursos de Ecologia e Biotecnologia, Reprodução Animal e Inseminação Artificial para o curso de Zootecnia e Biotecnologia da Reprodução para o curso de Medicina Veterinária. Ainda, em 2009, tornou-se membro do Colegiado do Núcleo Pesquisa e Extensão Acadêmicos (NUPEA) da FACENE/RN e orientador de projeto de pesquisa e extensão na referida instituição.

À pedra mais preciosa de minha vida, àquela que me gerou e me fez crescer, me dando todas as condições para que hoje estivesse aqui. À minha mãe Antonia Alves Brilhante Bezerra, exemplo de garra, determinação e amor aos seus filhos.

Dedico

*“Vem me pedir além do que eu posso dar,  
É aí que o aprendizado está.  
Vem de onde não sonhei me presentear.  
Quando chega o fim da linha e já não há aonde ir,  
Num passe de mágica  
A vida nos traz sonhos pra seguir.  
Queima meus navios pra eu me superar  
às vezes pedindo que ela vem nos dar o melhor de si.*

*E quando vejo, a vida espera mais de mim  
mais além, mais de mim.  
O eterno aprendizado é o próprio fim,  
Já nem sei se tem fim.  
De elástica, minha alma dá de si.  
Mais além, mais de mim.  
Cada ano a vida pede mais de mim  
mais de nós, mais além.*

*Vem me privar pra ver o que vou fazer,  
Me prepara pro que vai chegar.  
Vem me desapontar pra me ver crescer.  
Eu sonhei viver paixões, glamour  
Num filme de chorar.  
Mas como é Fellini, o dia-a-dia,  
Minha orquestra a ensaiar.  
Entre decadência e elegância, zique-zaguear.  
Hoje, aceito o caos.”*

*Jorge Vercilo*

## AGRADECIMENTOS

Apesar de repetitivo, eu não poderia deixar de colocar o Ser Supremo em primeiro lugar. Agradeço a Deus por todos os obstáculos superados e por não ter me abandonado a cada passo dado, a cada oportunidade e vitória concedida. Meu Deus, obrigado por ter me dado mais do que eu imaginava em tão pouco tempo.

Agradeço à minha querida UFERSA. Neste momento, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por ter contribuído com mais essa etapa de minha vida acadêmica. Agradeço também ao Departamento de Ciências Animais por ter me acolhido como Professor Substituto e por ter confiado na execução dos meus serviços.

Ao Professor Dr. Jael Soares Batista, profissional brilhante, que primariamente me iniciou na vida acadêmica, me orientou na monografia e também no início do mestrado, mas que não pudemos concluir o projeto. Agradeço pela contribuição decisiva na minha formação e pelo muito que aprendi contigo.

Ao Professor Dr. Alexandre Rodrigues Silva, não somente por ter me aceitado como orientado já após o processo de seleção, mas, por ter estimulado o meu crescimento sempre acreditando que eu podia fazer mais e melhor extraindo o máximo que eu podia mostrar e por ter me dado plena confiança na execução de todas as etapas deste mestrado, o que certamente me tornou um profissional muito mais dinâmico e seguro, capaz de ir além dos livros.

À Professora Dra. Nilza Dutra Alves, que tanto me auxiliou nas mais diversas questões, que me estimulou a almejar sempre mais e que tanto confiou em mim. Querida, você é para mim muito especial, obrigado por tudo.

Aos Professores Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura e Dra. Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte por aceitarem participar desta banca de mestrado, trazendo sua colaboração para o aprimoramento e enriquecimento desta dissertação. Agradeço ainda à Professora Aracely por ter me orientado em estágio docência ainda no início do mestrado.

Agradeço a todos os Mestres, independentemente em que fase da vida eles tenham contribuído com minha formação, mas que por serem Professores merecem todo o meu respeito e minha admiração. Hoje eu sei o quanto é difícil e laborioso se dedicar para formar alguém, mas, também sei o quanto é prazeroso e recompensador ter esta que pra mim, é uma das mais bonitas incumbências.

Agradeço a meu amigo e companheiro Thibério de Souza Castelo por ter comigo dividido todas as vitórias e derrotas, por ter caminhado e enlouquecido junto comigo (risos) e por ter estreitados os laços de amizade já existentes. Meu amigo, você sabe que esse mestrado é nosso, sem distinção de experimentos, certamente sem você teria sido bem mais difícil.

Agradeço ao casal nota 1.000 Heron de Medeiros Alves e Isabelle Rayanne de Oliveira Souza pela parceria longínqua, desde o tempo em que trabalhávamos na Patologia. Obrigado pela ajuda de inestimável valor e pela amizade consolidada.

Agradeço à minha psicoterapeuta Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra (risos), que é muito mais que uma técnica de laboratório, é uma amiga, e o melhor, uma amiga psicóloga. Quantas vezes eu não tive que desabafar e você ajudou a retirar as angústias do meu coração... Muito obrigado por tudo, você é uma pessoa maravilhosa, de coração bom.

Agradeço aos não somente colegas, mas, também amigos do laboratório, que me auxiliaram sempre que precisei. Hoje vocês são pessoas especiais que carregarei para sempre no coração. O meu muito obrigado é muito pouco diante do que a atitude de doação que vocês tiveram para comigo representou nesta etapa da minha vida. Érika Santos, Bruno Rodrigo, Gyslaine Peixoto, Rodrigo Lira, Gabriela Liberalino, Felipe Barros, Mariana de Araújo, Tiago Dantas vocês são anjos enviados por Deus para tornarem as coisas mais fáceis pra mim.

Aos meus Pais José Simão Bezerra e Antonia Alves Brilhante Bezerra por terem não somente me dado a vida, mas por toda dedicação na minha formação. Ainda que eu agradecesse infinitas vezes, isso não representaria a minha eterna gratidão. Por isso, não me canso de amá-los.

Ao meu irmão José Artur Brilhante Bezerra, pelas tantas aulas marcadas na projeção pra mim (risos), pelo companheirismo, por me ouvir quando eu precisei e por compartilhar as agonias e os momentos felizes.

A todos os meus familiares, pessoas que realmente vibram com a minha vitória e que representam para mim muitos momentos de alegria.

Agradeço à Lígia Silva de França, uma companheira para todos os momentos, minha melhor amiga e o amor da minha vida. Obrigado por fazer parte da minha vida e me agradecer com sua presença a cada dia, mesmo que distante. Agradeço pelos tantos conselhos, pelas palavras de conforto nos momentos de dificuldades (que foram muitos!), pelo simples ouvir quando precisei, pela paciência e tolerância para comigo. Você é muito especial e sei que foi Deus quem te mandou para mim. Amo-te.

Agradeço à FACENE/RN pela oportunidade do primeiro emprego e por ter, em tão pouco tempo, me delegado funções tão importantes na instituição. Agradeço a todos os colegas de trabalho por terem tão bem me acolhido.

Agradeço a todos os meus alunos, pessoas especiais com quem tenho tido o prazer de trocar informações e com quem tanto tenho aprendido.

Agradeço a todos àqueles que considero amigos e que contribuíram direta ou indiretamente para que eu galgasse mais este importante passo na minha vida.

Agradeço aos animais, seres especiais indissociáveis de nossas vidas e que contribuem para o continuar de nossa existência, que são também o conforto, a companhia, alegria, a fonte de renda e de alimento de tantas pessoas.

Agradeço ao Banco do Nordeste pelo auxílio financeiro para a execução deste experimento de mestrado.

## **CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO: EFEITOS DE DIFERENTES PALHETAS, TAXAS DE DESCONGELAÇÃO E CRIOPROTETORES**

BEZERRA, F. S. B. **Criopreservação do sêmen caprino: efeitos de diferentes palhetas, taxas de descongelamento e crioprotetores.** 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Produção e Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2009.

**RESUMO** – Avaliou-se o efeito de diferentes capacidades de palhetas, taxas de descongelamento e crioprotetores sobre a qualidade do sêmen caprino descongelado. Vinte e um ejaculados (sete/animal) foram coletados por meio de vagina artificial em três bodes. O sêmen foi diluído em Tris-gema de ovo (2,5%) a uma concentração final de 6% de glicerol, congelado em palhetas de 0,25 e 0,5 mL, ou de 6% de dimetilformamida (DMF) em palhetas de 0,5 mL. O sêmen criopreservado com glicerol foi descongelado a 37 °C/1min. ou 55 °C/7 seg. As palhetas de 0,5 mL de sêmen com glicerol ou DMF foram descongeladas a 37 °C/1 min., analisadas subjetivamente e pelo sistema de análise computadorizada de sêmen (CASA). Posteriormente, 14 cabras foram inseminadas por tempo fixo com sêmen criopreservado com glicerol e 14 com sêmen acrescido de DMF. Não se verificou interação entre a capacidade da palheta e a taxa de descongelamento que promovessem melhor taxa de recuperação espermática. Entretanto, a palheta de 0,5 mL gerou melhor preservação dos parâmetros cinemáticos ( $P < 0.05$ ). Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) foi encontrada entre o sêmen congelado com glicerol e DMF para a motilidade progressiva avaliada tanto subjetivamente quanto pelo CASA, para a linearidade e para a amplitude lateral da cabeça, o que confirma a eficiência do glicerol. Para a taxa de prenhez, não se observou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre o grupo inseminado com glicerol (42,7%) e o grupo inseminado com DMF (27,3%). Conclui-se que o sêmen caprino criopreservado deve ser envasado em palhetas de 0,5 mL e que não há vantagens na substituição do glicerol pela DMF para a criopreservação do sêmen caprino.

**Palavras-Chave:** criopreservação, sêmen caprino, dimetilformamida, capacidade da palheta, taxa de descongelamento.

## **CRYOPRESERVATION OF GOAT SEMEN: EFFECT OF DIFFERENT STRAW SIZES, THAWING RATES AND CRYOPROTECTANTS**

BEZERRA, F. S. B. **Cryopreservation of goat semen: effect of different straw sizes, thawing rates and cryoprotectants.** 2009. 93p. Thesis (Master's degree In Animal Science: Animal Production and Reproduction) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2009.

**SUMMARY** – The effect of different straw sizes, thawing rates and cryoprotectants on frozen-thawed goat semen quality was assessed. Twenty-one ejaculates (seven per animal) were collected from three bucks using an artificial vagina. Semen was diluted in Tris-egg yolk (2.5%) in a final concentration of 6% glycerol, frozen in 0.25- and 0.5 mL straws, or in 6% dimethylformamide (DMF) frozen in 0.5 mL straws. Semen plus glycerol was thawed at 37 °C/1 min. or 55 °C/7 s. Semen plus glycerol or DMF packed in 0.5mL straws was thawed at 37 °C/1 min., and evaluated by Computerized Sperm Class Analyzer (CASA). Thereafter, fourteen does were inseminated by fixed time using semen plus glycerol, and another fourteen with semen plus DMF. There was no interaction between straw size and thawing rate to promote a better sperm recovery rate, but the use of 0.5mL straw promoted a better preservation of kinematic parameters than the 0.25 mL one ( $P < 0.05$ ). Significant difference ( $P < 0.05$ ) was found for progressive motility assessed subjectively or by CASA, for linearity, and for amplitude of lateral head between semen cryopreserved with glycerol and DMF, which confirm the efficiency of that cryoprotectant. There was no difference ( $P > 0.05$ ) between the fertility rate achieved by group inseminated using glycerol (42,7%) in comparison to group inseminated with DMF (27.3%). In conclusion, goat semen should be packed in 0.5mL straws, and there is no advantage in substitution DMF by glicerol in the cryopreservation of goat semen.

**Keywords:** cryopreservation, goat semen, dimethylformamide, straw size, thawing rate

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
ACP	Água de coco em pó
ALH	Amplitude lateral da cabeça
BCF	Frequência de batimento de cauda
BnB	Banco do Nordeste
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
cm	Centrímetro
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbicos
DMF	Dimetilformamida
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
E.P.	Erro Padrão
EYCE	Enzima coaguladora da gema-de-ovo
g	Gramas
GLM	<i>General Linear Model</i>
HOST	Teste hipo-osmótico
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
L	Litro
LIN	Linearidade
m	Metro
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
mg	Miligramas
min.	Minutos
mL	Mililitros
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
mol	Moleculagrama
mOsm	Miliosmóis
MHz	MegaHertz
n	Amostra
NC	New California
N <sub>2</sub>	Nitrogênio líquido
P	Probabilidade
pH	Potencial hidrogeniônico
s	Segundos
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SCA	<i>Sperm Class Analyzer</i>
SBUIII	Enzima da glândula bulbo-uretral de caprinos
STR	Retilinearidade
TE	Transferência de embriões
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-árido

UI	Unidades internacionais
USA	Estados Unidos da América
VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilínea
vs.	Versus
VSL	Velocidade linear progressiva
μL	Microlitros

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios ( $\pm$ E.P.) das características do sêmen caprino congelado envasado em palhetas de 0,25 e 0,5 mL e descongelado a taxas de 37 °C/1 min. ou 55 °C/7 s.....	46
Tabela 2 – Valores médios ( $\pm$ E.P.) para os parâmetros avaliados no sêmen caprino descongelado comparando-se o efeito isolado das taxas de descongelação e das capacidades da palheta.....	46
Tabela 3 – Valores médios ( $\pm$ E.P.) para os parâmetros subjetivos do sêmen caprino criopreservado com glicerol ou dimetilformamida (DMF) como crioprotetor.....	61
Tabela 4 – Médias ( $\pm$ E.P.) dos parâmetros de motilidade mensurados pelo CASA para o sêmen caprino descongelado (n = 21) e criopreservado usando-se glicerol ou dimetilformamida (DMF) como crioprotetor.....	62
Tabela 5 – Proporção de espermatozóides nas quatro subpopulações espermáticas definidas pelo CASA para o sêmen caprino descongelado usando-se glicerol ou dimetilformamida (DMF) como crioprotetor.....	62

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>16</b>
1.1 PERFIL DA CAPRINOCULTURA NO NORDESTE.....	16
1.2 REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM CAPRINOS.....	17
1.3 COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO.....	18
1.4 CRIOINJÚRIAS.....	21
1.5 CRIOPROTETORES.....	22
1.6 DILUENTES USADOS NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO.....	24
1.7 CRIOPRESERVAÇÃO, PROCESSAMENTO E ACONDICIONAMENTO DO SÊMEN CAPRINO.....	25
1.8 TAXAS DE DESCONGELAÇÃO.....	27
1.9 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR TEMPO FIXO.....	28
1.10 OBJETIVOS.....	29
<b>1.10.1 Geral.....</b>	<b>29</b>
<b>1.10.2 Específicos.....</b>	<b>29</b>
1.11 REFERÊNCIAS.....	30
<b>2 CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A CAPACIDADE DA PALHETA E A TAXA DE DESCONGELAÇÃO E SEU IMPACTO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CAPRINO DESCONGELADO <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>40</b>
2.1 RESUMO.....	40
2.2 INTRODUÇÃO.....	40
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
<b>2.3.1 Composição do grupo experimental.....</b>	<b>42</b>
<b>2.3.2 Coleta de sêmen.....</b>	<b>42</b>
<b>2.3.3 Avaliação seminal.....</b>	<b>42</b>
<b>2.3.4 Processamento e acondicionamento do sêmen.....</b>	<b>43</b>
<b>2.3.5 Descongelamento das palhetas.....</b>	<b>44</b>
<b>2.3.6 Análise estatística.....</b>	<b>44</b>
2.4 RESULTADOS.....	44
<b>2.4.1 Características do sêmen fresco e diluído.....</b>	<b>45</b>
<b>2.4.2 Características do sêmen descongelado.....</b>	<b>45</b>
<b>2.4.3 Efeitos isolados das palhetas e das taxas de descongelamento.....</b>	<b>46</b>
2.5 DISCUSSÃO.....	47
2.6 CONCLUSÕES.....	49
2.7 REFERÊNCIAS.....	50
<b>3 CAPÍTULO 3 – EFEITOS CRIOPROTETORES DA DIMETILFORMAMIDA NA CONGELAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO: EFICIÊNCIA <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>54</b>
3.1 RESUMO.....	59
3.2 INTRODUÇÃO.....	60
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
<b>3.3.1 Animais experimentais.....</b>	<b>61</b>

3.3.2 Coleta e avaliação inicial do sêmen.....	62
3.3.3 Processamento do sêmen.....	62
3.3.4 Análise computadorizada de sêmen.....	63
3.3.5 Inseminação artificial e diagnóstico de gestação.....	64
3.3.6 Análise estatística.....	65
3.4 RESULTADOS.....	65
3.4.1 Sêmen fresco e diluído.....	65
3.4.2 Características do sêmen após a descongelação.....	66
3.4.3 Taxa de fertilidade.....	67
3.5 DISCUSSÃO.....	67
3.6 CONCLUSÕES.....	72
3.7 REFERÊNCIAS.....	72
<b>ANEXOS.....</b>	<b>79</b>
ANEXO 01 - CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “ASSESSMENT OF THE INTERACTION BETWEEN STRAW SIZE AND THAWING RATE AND ITS IMPACT ON IN VITRO QUALITY OF POST-THAW GOAT SEMEN” À REVISTA THERIOGENOLOGY.....	80
ANEXO 02 - ASSESSMENT OF THE INTERACTION BETWEEN STRAW SIZE AND THAWING RATE AND ITS IMPACT ON IN VITRO QUALITY OF POST-THAW GOAT SEMEN.....	81
ANEXO 03 – DESCRIÇÃO DOS MODELOS ESTATÍSTICOS UTILIZADOS.....	91
<b>A) Modelo estatístico utilizado no experimento do Capítulo 3.....</b>	<b>91</b>
<b>B) Modelo estatístico utilizado no experimento do Capítulo 4.....</b>	<b>92</b>

## 1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1 PERFIL DA CAPRINOCULTURA NO NORDESTE

A criação de caprinos é realizada no Brasil desde a época da colonização, com primeiro registro em 1535, quando foi introduzida no território nacional pelos primeiros exploradores portugueses (SEAPA, 2006). Apesar disto, a caprinocultura brasileira ainda é caracterizada, em grande medida, pela multiplicidade de objetos na exploração, o que resulta em pequeno grau de especialização do segmento no País (SIMPLÍCIO et al., 2003). Essa característica, aliada ao baixo nível educacional dos caprinocultores brasileiros (NOGUEIRA; MELLO, 2005), faz com que as técnicas de gerenciamento e manejos utilizados na criação e abate dos rebanhos sejam bem inferiores aos principais concorrentes internacionais. Dessa forma o Brasil possui um efetivo de cerca de 9,3 milhões de caprinos, e, deste montante, a região Nordeste desponta como a principal desenvolvedora da atividade com cerca de 8,5 milhões (91% do rebanho nacional) (IBGE, 2008), o que faz da caprinocultura uma importante alternativa para o desenvolvimento social e econômico dessa região (LIMA, 2008).

Entretanto, no Nordeste, a grande maioria dos caprinocultores adota uma criação de subsistência, com manejo extensivo e explora basicamente carne e pele (PEDROSA et al., 2003). Além disso, o manejo sanitário é precário e a mortalidade de animais, principalmente de jovens, é alta, o que compromete seriamente o desenvolvimento da atividade (PINHEIRO et al., 2000; PEDROSA et al., 2003; FILGUEIRA et al., 2009). Assim, problemas como helmintoses, linfadenite, mastite, pneumonia e artrite são frequentes (PINHEIRO et al., 2000).

Aliado a esses fatores, o manejo reprodutivo também apresenta sérias deficiências, e, as biotécnicas reprodutivas são ainda subutilizadas, especialmente na Zona Semi-Árida da região Nordeste (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995). Isso ocorre devido à falta de informação técnica e de apoio aos criadores, ao custo inicial para implantação de programas de inseminação artificial (IA) e à deficiência da escrituração zootécnica em muitas propriedades. Enfatiza-se, ainda, a baixa disponibilidade de sêmen e de reprodutores submetidos aos testes de progênie, a falta de estrutura para comercialização e transporte

adequado para o sêmen e, principalmente, as dificuldades no processo de preservação do sêmen sob a forma congelada, com resultados insatisfatórios nos índices de concepção (RITAR; SALAMON, 1983; KARATZAS et al., 1997).

## 1.2 REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM CAPRINOS

Apesar das dificuldades apresentadas no Brasil, em nível mundial a caprinocultura apresenta um ciclo de crescimento que vem se intensificado nas últimas décadas, sobretudo em países desenvolvidos, atualmente detentores dos maiores rebanhos. Acompanhando esta tendência mundial, projeta-se uma multiplicação da ordem de cinco vezes o rebanho brasileiro atual para os próximos vinte anos. Assim, dentro desta perspectiva, haverá ampla necessidade de se assistir a reprodução destes animais, seja para permitir o aumento da eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos, ou para a multiplicação mais eficiente dos genótipos (FONSECA, 2005a).

Em caprinos, a transferência de embriões (TE) é uma técnica de manejo de reprodução que ainda está em fase de consolidação no Brasil, tendo como um dos seus objetivos maximizar o potencial reprodutivo da fêmea, explorando seu potencial biológico ao extrapolar suas possibilidades naturais. Essa biotécnica envolve algumas etapas que englobam desde a seleção dos animais até a inovulação. O perfeito funcionamento de cada uma dessas etapas será responsável pelo sucesso final de todo o processo. Portanto, é necessário dominar cada uma das etapas de acordo com as características e os problemas inerentes (PAULA et al., 2008).

A produção de embriões *in vitro* nos pequenos ruminantes tem uma importância fundamental principalmente devido à produção de material para pesquisa básica a um baixo custo. Estes estudos possibilitam a introdução comercial de biotecnologias de ponta como transferência nuclear e produção de transgênicos (COGNIÉ et al., 2003).

Apesar da existência de todas essas biotécnicas, em todo o mundo, independente de espécie, a IA é a que mais tem contribuído para a melhoria genética dos rebanhos (SIMPLÍCIO et al., 2005). E, o processo de criopreservação do sêmen tem favorecido sua utilização por um longo período de tempo, possibilitado a ampla difusão de material genético de alta qualidade além de propiciar a redução de custos e do estresse com o transporte de

animais (CASTELO et al., 2008). Além disso, em combinação com a sincronização hormonal do estro e da ovulação, essas biotécnicas permitem a produção de crias e de leite em períodos do ano que não coincidem com a época da estação natural de cobrição de diversas espécies que possuam anestro estacional como a cabra, manifestado nas regiões com estações do ano bem definidas (CORTEEL et al., 1988).

### 1.3 COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

A avaliação da aptidão reprodutiva de um macho destinado à reprodução fundamenta-se na observação da saúde geral, saúde hereditária, saúde genital, *potentia coeundi* (capacidade de cópula) e *potentia generandi* (capacidade de fertilização) (MANUAL..., 1998).

Desta feita, o espermograma assume grande importância ao passo que permite a valoração da qualidade do reprodutor, visto que ele demonstra sua *potentia generandi*. O exame do sêmen é feito inicialmente a olho nu, sem auxílio de qualquer instrumento (avaliação macroscópica). Em seguida, o sêmen é avaliado por métodos laboratoriais e à microscopia (avaliação físico-química e microscópica) (REICHENBACH et al., 2008). Segundo HAFEZ; HAFEZ (2004), não existe prova específica que seja concludente da fertilidade dos ejaculados individuais, mas, a combinação da avaliação bioquímica e do espermograma constitui a melhor opção disponível para determinar a capacidade fecundante de um macho.

Entretanto, para que esse exame se torne possível é necessário proceder à coleta do sêmen, variável conforme a espécie trabalhada. A coleta do sêmen em caprinos pode ser realizada através de vagina artificial ou eletroejaculação (KOZDROWSKI et al., 2007; BATISTA et al., 2009; SANTIAGO-MORENO, 2009). Contudo, o método da vagina artificial conjugado com o manequim ou uma fêmea (em cio ou não) é o mais empregado e o que obtém as características mais próximas das reais (SALVIANO; SOUZA, 2008).

Segundo MIES FILHO (1987), macroscopicamente, o sêmen pode apresentar aspecto cremoso, leitoso, opalescente ou soroso e aquoso. Segundo este autor, à simples vista, pode-se efetuar a valoração do ejaculado, de forma empírica, quanto à sua riqueza em

espermatozóides. O sêmen do bode tem coloração que varia de branca acinzentada a amarela (HAFEZ; HAFEZ, 2004), enquanto o volume varia de 0,2 a 2 mL (NEVES et al., 2008).

Microscopicamente, pode-se observar o turbilhão ou movimento de massa, que consiste na avaliação subjetiva do movimento de ondas em uma gota do sêmen *in natura*. Esta análise é expressa em valor de 0 a 5, onde 0 é a ausência de turbilhão (o que não implica ausência de motilidade) e 5 o valor máximo dado para um acentuado movimento de massa. A intensidade do movimento é resultante da interação da motilidade, do vigor e da concentração espermática (MANUAL..., 1998; SALVIANO E SOUZA, 2008). Amostras com turbilhão abaixo de 3 podem comprometer os resultados da inseminação em pequenos ruminantes (NEVES et al., 2008).

A motilidade é expressa pela porcentagem total de espermatozóides móveis (MANUAL..., 1998), sendo uma das principais características a ser avaliadas no espermograma, por avaliar a capacidade fecundante (MIES FILHO, 1987). Assim, as amostras de sêmen caprino devem apresentar um mínimo de 60% de motilidade para serem utilizadas imediatamente ou criopreservadas (NEVES et al., 2008). Já o vigor é a característica que representa a força do movimento, o que acaba influenciando a velocidade com que os espermatozóides se movimentam, sendo classificada em escala de 0 a 5, onde 0 é a ausência de movimento e 5 o movimento progressivo veloz (SALVIANO; SOUZA, 2008).

Entretanto, a análise de convencional da motilidade espermática é uma estimativa subjetiva e possui um baixo valor preditivo de fertilidade devido à alta variabilidade observada entre avaliadores e laboratórios. Assim, sistemas de análise computadorizada de sêmen têm sido desenvolvidos para aumentar a objetividade da avaliação tanto da motilidade quanto da morfologia espermática (VERSTEGEN et al., 2002). O CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) é um sistema automático (*hardware* e *software*) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula, a partir da reconstrução da trajetória da cabeça do espermatozóide, bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN; KATZ, 2004). Assim, vários estudos em caprinos para avaliar a capacidade de migração do espermatozóide no muco cervical (COX et al., 2006), diferentes diluentes (DORADO et al., 2007), diferentes protocolos de congelação (KAZDROWSKI et al., 2007) ou mesmo a congelabilidade de amostras isoladas de sêmen têm utilizado este método de avaliação (DORADO et al., 2009).

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozoides utilizam-se esfregaços corados ou preparações úmidas, em microscópio de contraste de fase ou óptico sob óleo de imersão (aumento de 1000 x) onde as primeiras 200 células observadas são classificadas quanto aos defeitos de forma e estrutura (NEVES et al., 2008; SALVIANO; SOUZA, 2008). A partir das anormalidades espermáticas, tenta-se relacionar patologia espermática e fertilidade (SALVIANO; SOUZA, 2008). Blom (1950) procurou dar uma interpretação dinâmica ao estudo da morfologia espermática, dividindo as anormalidades em duas classes: anormalidades primárias (verificadas durante o processo espermatogênico, são intragonadais) e secundárias (afetam o espermatozoide depois de formado, também consideradas extragonadais). Para caprinos, a porcentagem referência para espermatozoides normais é, em média, 80 a 90% (MIES FILHO, 1987; MANUAL..., 1998; HAFEZ; HAFEZ 2004, NEVES et al., 2008).

A concentração espermática representa o número de espermatozoides por milímetro cúbico ( $\text{mm}^3$ ) ou centímetro cúbico ( $\text{cm}^3 = \text{mL}$ ). O procedimento mais comum para se obter a concentração espermática consiste na contagem das células através de microscopia óptica no hemocítometro, ou como é mais conhecida: câmara de Neubauer, utilizando-se uma parte de sêmen para 400 de solução formol-salina tamponada, embora também se possa utilizar a espectrofotometria ou o *micro-cell-counter* (NEVES et al., 2008; SALVIANO; SOUZA, 2008). De acordo com AZEVEDO e TONIOLLI (2005), a concentração média do sêmen de bodes criados no Nordeste do Brasil é de  $1,5 \pm 0,09 \times 10^9$  espermatozoides/mL.

A viabilidade espermática está relacionada com a integridade da membrana plasmática, que pode ser avaliada por meio de colorações vitais (EVANS; MAXWELL, 1990; CHEMINEAU et al., 1991). Dentre os corantes utilizados, podem ser citados a eosina-nigrosina (EVANS; MAXWELL, 1990; CHEMINEAU et al., 1991; BEARDEN; FUQUAY, 1992), azul de tripan (BEARDEN; FUQUAY, 1992) e azul de bromofenol (MEDEIROS, 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

O teste hiposmótico (HOST) apresenta-se como uma boa ferramenta para avaliar a integridade de membrana do espermatozoide caprino (NEVES et al., 2008). De acordo com Fonseca et al. (2005b), o teste é realizado sob microscopia de contraste de fase, no qual os espermatozoides são submetidos a um meio hipotônico e procede-se à contagem de 200 células, em pelo menos 5 campos diferentes, sendo os espermatozoides classificados em reagidos (cauda enrolada) ou não reagidos (cauda reta). Os mesmos pesquisadores visando

padronizar uma solução hiposmótica para uso no sêmen caprino testaram 10 soluções a base de citrato de sódio e frutose com osmolaridades (mOsm/L) de 50 , 75 , 100 , 125, 150 , 175, 200, 250, 290 e 300 mOsm/L, e encontraram como resultados as respectivas porcentagens: 34,1; 38,8; 45,3; 51,5; 46,8; 42,8; 38,2; 29,0; 19,4; e 23.1%, demonstrando que a solução de 125 mOsm/L apresenta-se como a melhor opção para a avaliação desse parâmetro seminal. Entretanto, CORTÉS et al. (1993) e SOUSA et al. (2001) indicam que a solução hiposmótica aconselhada para a determinação e seleção de indivíduos de maior qualidade seminal é a solução de 100 mOsm/L.

Outras provas podem ser utilizadas para a avaliação da qualidade seminal em caprinos, como o teste de termorresistência, que avalia a longevidade espermática e o teste de interação oócito-espermatozóide, realizado por fecundação *in vitro* homóloga e heteróloga (NEVES et al., 2008).

#### 1.4 CRIOINJÚRIAS

Os processos de congelação e descongelação do sêmen induzem danos bioquímicos, funcionais e ultra-estruturais aos espermatozoides (WATSON, 2000), resultando em redução da motilidade, integridade de membrana e capacidade de fertilização (PURDY, 2006).

Particularmente, a congelação induz injúrias diretas às células, explicadas por duas hipóteses dependendo da taxa de congelação do sistema: a formação de gelo intracelular a taxas rápidas de congelação, e, o “efeito solução” a taxas lentas de congelação (MAZUR, 1970). Quando a taxa de congelação é rápida, a água intracelular congela e forma cristais de gelo, tidos como letais para a célula. Por outro lado, quando a taxa de congelação é lenta os cristais de gelo se formam na solução extracelular primeiro, o que gera um aumento na concentração de eletrólitos da fração não congelada. O aumento na concentração induz, conseqüentemente, desidratação celular através de uma diferença de pressão osmótica. Se a desidratação é severa, toxicidade ou injúria celular pode ser induzida devido à alta concentração de eletrólitos, o que é denominado de “efeito solução” (FAHY, 1980). Sabe-se que a formação de cristais intracelulares é letal e consiste no principal mecanismo de danos envolvido quando usadas taxas rápidas de congelação (TONER et al., 1993), mas, a injúria pelo “efeito solução” não está completamente compreendida (HAN; BISCHOLF, 2004).

Porém, tanto o gradiente osmótico extracelular quanto a formação de cristais de gelo intracelulares causam alterações na organização das membranas bem como na função das organelas (MAZUR, 1984).

### 1.5 CRIOPROTETORES

No intuito de reduzir as crioinjúrias, várias substâncias foram utilizadas como crioprotetores, que são componentes normalmente não encontrados nas células vivas (FULLER, 2004, PURDY, 2006). De acordo com AMANN (1999), os crioprotetores se classificam como penetrantes ou não-penetrantes. Um crioprotetor não-penetrante, não consegue atravessar a membrana plasmática e age extracelularmente. Assim, ele pode atuar como um soluto e reduzir a temperatura de congelação do meio. Já os crioprotetores penetrantes, são permeáveis à membrana plasmática e agem intra e extracelularmente. Como são solúveis, causam a desidratação do espermatozóide devido ao fluxo de água osmoticamente direcionado. Após curtos períodos de tempo, o crioprotetor e a água se equilibram, resultando em iguais concentrações extra e intracelulares.

Para ASHWOOD-SMITH (1987) a classificação dos crioprotetores se dá em dois grupos: álcoois (etilenoglicol, glicerol, etc.) e amidas, ambos enquadrados como crioprotetores penetrantes na classificação de AMMAN (1999). ASHWOOD-SMITH (1987) sugeriu ainda que um crioprotetor ideal deve possuir um baixo peso molecular, boa solubilidade em água e mínima toxicidade aos espermatozoides.

Assim, apesar de tanto o glicerol quanto as amidas protegerem as células espermáticas durante a criopreservação, suas propriedades crioprotetoras são explicadas por diferentes mecanismos (BIANCHI et al., 2008). O glicerol ( $\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) é um álcool que contém três grupos funcionais hidroxila, que podem aceitar o hidrogênio da molécula de água em seis diferentes sítios de ligação. Além disso, os radicais hidroxila do glicerol podem algumas vezes ligar-se entre si, reduzindo a probabilidade de ligação com as moléculas de água, o que é indesejável devido à alta viscosidade da solução, responsável pela penetração mais lenta do crioprotetor na membrana plasmática, induzindo estresse osmótico (GILMORE et al., 1995; KAROW, 2001). Já as amidas são formadas por grupos funcionais que contém nitrogênio ( $\text{NH-C=O}$ ). As amidas interagem com a água pela ligação do seu conteúdo de nitrogênio e

hidrogênio ao hidrogênio presente na molécula de água. As amidas são altamente lipofílicas pela incorporação do grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) na sua molécula, o que eleva a sua permeabilidade através da membrana plasmática do espermatozóide (KAROW, 2001; BIANCHI et al., 2008). Também, a natureza altamente hidrofílica da molécula de amida permite que haja uma alta interação com a água, reduzindo a formação dos cristais de gelo intracelular. Ademais, devido a seu baixo peso molecular e viscosidade em comparação ao glicerol (enquanto o peso molecular do glicerol é de 92 g/mol, da metilformamida 59 g/mol e da dimetilformamida 73 g/mol), as amidas possuem alta permeabilidade na membrana, penetrando na membrana plasmática dos espermatozoides com maior rapidez e reduzindo a possibilidade de dano celular causado por estresse osmótico (BALL; VO, 2001). Assim, o efeito crioprotetor das amidas pode ser atribuído à sua habilidade de permear a membrana da célula devido ao seu baixo peso molecular, propriedade esta que provavelmente permite a esses compostos ligar-se de maneira mais eficiente que o glicerol às moléculas de água (KAROW, 2001; BALL; VO, 2001).

Todavia, sabe-se que os crioprotetores podem apresentar níveis de toxicidade dependentes de sua concentração e da duração da exposição das células a estes agentes, o que denota a importância da identificação da concentração ideal que balanceie a toxicidade e a ótima crioproteção (FULLER, 2004).

Logo, apesar do glicerol ser o crioprotetor eletivo utilizado não somente para o sêmen caprino (PURDY, 2006) como também para a maioria das espécies animais (ALVARENGA et al., 2005), esta substância apresenta-se tóxica aos espermatozoides (HOLT, 2000). Tal toxicidade pode resultar em desnaturação protéica, alteração das interações da actina e indução de bolhas na membrana (ALVARENGA et al., 2005). HAMMERSTEDT e GRAHAM (1992) revisaram outros efeitos celulares causados pelo glicerol, que incluíram alterações nos eventos citoplasmáticos pelo aumento da viscosidade intracelular, alteração da polimerização da tubulina, alteração da associação dos microtúbulos, efeitos no balanço bioenergético e alteração direta na membrana plasmática e glicocálice. A toxicidade do glicerol é parcialmente induzida pelo estresse osmótico, pois o glicerol penetra a membrana plasmática mais lentamente que outros crioprotetores (GILMORE et al., 1995).

Para eqüinos (ALVARENGA et al., 2005), coelhos (OKUDA et al., 2007) e suínos (BIANCHI et al., 2008) as amidas foram sugeridas como crioprotetores alternativos para a congelação do sêmen daqueles machos que primariamente apresentaram-se mais sensíveis aos

efeitos tóxicos do glicerol (WATSON, 1995; HAY et al., 1997). SILVA et al. (2006) reportaram que a dimetilformamida poderia ser uma alternativa viável para a criopreservação do sêmen caprino usado isoladamente ou em associação com o glicerol, porém, neste estudo, somente testes *in vitro* foram desenvolvidos de maneira subjetiva. Assim, estudos de avaliação objetiva do sêmen caprino, e testes *in vivo* poderiam demonstrar os efeitos crioprotetores da DMF nesta espécie e elucidar se a mesma é realmente um crioprotetor alternativo frente ao glicerol para uso no sêmen da espécie ora abordada.

## 1.6 DILUENTES USADOS NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

Os diluentes são utilizados com o intuito de proteger os espermatozóides dos efeitos críticos da congelação. Um bom diluente se caracteriza pela ausência de toxicidade à célula espermática; pela osmolaridade adequada, onde o espermatozóide caprino prefere meios hipertônicos entre 425 e 525 mOsm; poder nutritivo e tampão eficaz; pelos estabilizadores de membrana; pelo pH (potencial hidrogeniônico) em torno da neutralidade (para caprinos entre 6 e 8), que favorece a sobrevivência espermática e, por último, por ser de fácil preparo e baixo custo (CONCANNON; BATISTA, 1989; PURDY, 2006).

Segundo GIBBONS (2002), é imprescindível na composição de um diluente usado para a congelação do sêmen caprino uma substância tampão como o Tris, sais como o citrato de sódio, um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose ou trealose), crioprotetores penetrantes (glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfóxido) e não-penetrantes (leite ou gema de ovo) além de antibióticos, sendo a penicilina e a estreptomicina os mais utilizados.

Um dos diluentes mais utilizados para sêmen caprino é o Tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo e glicerol (NEVES et al., 2008). O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano -  $H_2NC(CH_2OH)_3$ ) é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Ele permanece estável em temperatura ambiente por diversos meses, atuando como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (MCPHAIL; GOODMAN, 1984).

De acordo com PURDY (2006), além do Tris, diluentes à base de leite em pó desnatado também são muito utilizados, entretanto o primeiro confere os melhores resultados de motilidade após a descongelação (DEKA; RAO, 1987). Isso porque o sêmen caprino

apresenta particularidades que limitam o uso exacerbado de diluentes ricos em fosfolipídeos, como aqueles à base de leite ou mesmo com altas proporções de gema de ovo. Tal fato se deve a certos componentes do plasma seminal específicos desta espécie e produzidos principalmente na contra-estação sexual (NEVES et al., 2008). Esses componentes foram primariamente definidos como EYCE (enzima coaguladora da gema-de-ovo) (ROY, 1957) e SBUIII (proveniente da glândula bulbouretral e que causava decréscimo da sobrevivência espermática quando se usava diluentes a base de leite) (NUNES et al., 1982). Entretanto, estudos mais recentes identificaram essas duas enzimas como sendo a mesma molécula (LEBOEUF et al., 2000). Trata-se da fosfolipase A, uma glicoproteína lipase produzida na glândula bulbouretral dos caprinos que hidrolisa fosfolipídeos presentes nos diluentes, formando lisolecitinas e ácidos graxos, substâncias tóxicas aos espermatozóides (PURDY, 2006). Diante deste problema, buscou-se um meio diluente pobre em fosfolipídeos, sendo então desenvolvida a água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>) como uma alternativa viável para a diluição do sêmen caprino (NEVES et al., 2008).

## 1.7 CRIOPRESERVAÇÃO, PROCESSAMENTO E ACONDICIONAMENTO DO SÊMEN CAPRINO

Aproximadamente 60 anos se passaram desde o primeiro relato de sucesso na criopreservação do sêmen caprino (SMITH; POLGE, 1950). Mesmo assim, apesar de todo este tempo, o processo de criopreservação nesta espécie não é tão eficiente, observando-se comumente decréscimos de aproximadamente 50% na motilidade espermática após o procedimento de descongelamento (AZERÊDO et al., 2001; CHOE et al., 2006; KOZDROWSKI et al., 2007).

Sabe-se que a criopreservação do sêmen das espécies domésticas é um processo complexo que envolve o balanço de muitos fatores tendo em vista a obtenção de resultados satisfatórios. Para garantir o sucesso no processo de congelamento é necessário ter o conhecimento não somente do diluente apropriado, das taxas de diluição, resfriamento ou descongelamento, mas também o conhecimento da própria fisiologia espermática da espécie, que é essencial para a recuperação espermática máxima após a descongelamento, e, conseqüentemente, para a obtenção de altas taxas de fertilidade (PURDY, 2006).

Segundo PURDY (2006), a taxa de diluição do sêmen caprino pode variar entre 1:1 a 1:23 (sêmen : diluente), sendo possível a utilização de uma dose prática de 1:9 quando não se dispõe de meios para determinar com eficácia a concentração pós-diluição de aproximadamente  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL (NUNES, 2002).

De acordo com CASTELO et al. (2008), a diluição do sêmen caprino deve ser realizada logo depois da coleta do sêmen, na qual tanto o ejaculado quanto o diluente devem ser mantidos em banho-maria a 37 °C por 5 min. para garantir que os dois estejam à mesma temperatura. A diluição é feita fluindo lentamente o diluente para o tubo contendo o sêmen. Após a diluição inicial, o sêmen deve ser resfriado em geladeira por 45 min. dentro de um recipiente contendo água, até atingir 12° C, sendo levado, em seguida, a um freezer para que atinja a marca de 4 °C. Nesta temperatura é realizada a glicerolização, com a fração do diluente que contém glicerol, em até três etapas, que constam da adição, a cada 5 min., de uma alíquota do diluente, fazendo com que o volume dobre e que a concentração espermática contida na primeira diluição seja reduzida pela metade (NEVES et al., 2008). A congelação deverá ser feita em vapor de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) usando-se uma rampa de congelação com 4-5 cm, durante 4-5 min., e posteriormente submerso em N<sub>2</sub> (LEBOEUF et al., 2000).

Para o acondicionamento do sêmen congelado há duas alternativas possíveis. Na primeira, a congelação é processada em pastilhas, com gelo seco. Na segunda o sêmen é processado e envasado em palhetas (NEVES et al., 2008).

A congelação do sêmen em pastilhas é uma alternativa simples, rápida e barata, mas o manejo é problemático porque as amostras não podem ser identificadas e estão expostas à contaminação na estocagem e na manipulação (NEVES, 2008). Uma vez que a amostra é resfriada, alíquotas de sêmen de 0,1-0,3 mL são distribuídas dentro de concavidades do bloco de gelo seco (dióxido de carbono sólido a -79 °C) e congeladas durante 2 a 4 min. As pastilhas são então mergulhadas em N<sub>2</sub> para armazenamento (EVANS; MAXWELL, 1987; CHEMINEAU et al., 1991).

Já a congelação do sêmen em palhetas é uma técnica mais cara e laboriosa que o acondicionamento em pastilhas, porém cada amostra pode ser identificada, fornecendo condições para um manejo mais adequado do sêmen (PURDY, 2006). Após a diluição e resfriamento do sêmen, as amostras são colocadas dentro de palhetas com capacidades de 0,25 ou 0,5 mL, dispostas em uma rampa de congelação (composta de uma grade de ferro dentro de uma caixa de poliestireno expandido) e congeladas em vapor de N<sub>2</sub> à temperatura variável

conforme a altura das palhetas sobre a rampa, sendo posteriormente armazenadas em botijão de N<sub>2</sub> (GRAVANCE et al., 1997; LEBOEUF et al., 2000).

RITAR et al. (1990a,b) reportaram que a congelação de sêmen caprino em pastilhas gerou uma maior motilidade após a descongelação (39%), comparada ao sêmen envasado em palhetas. Entretanto, a motilidade espermática foi similar para o sêmen congelado em palhetas de 0,25 (33% de motilidade após a descongelação) ou de 0,5 mL (34% de motilidade após a descongelação). Diferenças na motilidade, viabilidade e fertilidade após a descongelação podem ser atribuídas às diferentes taxas de resfriamento produzidas pelos métodos de congelação em pastilhas e em palhetas (RITAR, 1993).

No entanto, de acordo com JONHSON et al. (1995), o padrão de resfriamento e início da cristalização depende, dentre outros fatores, da capacidade da palheta. A palheta de 0,25 mL apresenta uma maior superfície de contato que a palheta de 0,5 mL, o que pode elevar a possibilidade de ocorrência de mudanças bruscas na temperatura do sêmen dentro da palheta com o processo de congelação ou descongelação. Tais mudanças podem comprometer a recuperação de espermatozóides vivos após a descongelação, e assim, reduzir a fertilidade.

## 1.8 TAXAS DE DESCONGELAÇÃO

A taxa de descongelação é um importante fator que afeta a qualidade do sêmen criopreservado (TULI et al., 1991). Tal taxa ideal visando a recuperação de uma maior proporção de espermatozóides é variável de acordo com a espécie. Segundo MOCÉ et al. (2003), que avaliaram as taxas de descongelação de 50 °C e 70 °C ambas durante 10-12 s para o sêmen de coelhos, as melhores taxas de fertilidade e prolificidade são alcançadas com a descongelação a 50 °C. Vidament et al. (2001), ao estudarem a motilidade espermática do sêmen equino descongelado a diversas temperaturas e tempos de descongelação (37 °C e 30 s, 50 °C e 10 s, 50 °C e 20 s, 60 °C e 10 s, 75 °C e 5 s, 75 °C e 10 s e 75 °C e 15 s), não observaram diferenças entre os tratamentos, exceto para a descongelação a 75 °C e 15 s, que diferiu dos demais, quando a motilidade foi zero. Em bovinos, as taxas de descongelação de 5 °C/10 min., 20 °C/4 min., 35 °C/4 min., 50 °C/75 s, 65 °C/48 s., 80 °C/37 s e 100 °C/20s foram comparadas, sendo que as taxas de 20 °C/4 min. e 35 °C/4 min. promoveram as maiores porcentagens de espermatozóides móveis e de acrossomas intactos (OLAR et al., 1977).

Tradicionalmente, o sêmen caprino envasado em palhetas é descongelado a 37 °C durante 12 a 30 s (CABRERA et al., 2005; PURDY, 2006), porém, outro protocolo mais lento (5 °C/2 min. em banho-maria) pode ser utilizado com menor eficiência na taxa de recuperação espermática (DEKA; RAO, 1987). KOZDROWSKI et al. (2007) utilizaram uma taxa de descongelamento de 40 °C/30 s para o sêmen caprino, obtendo resultados consideráveis de motilidade pós-descongelamento. TULI et al. (1991) observaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da motilidade progressiva para o sêmen caprino descongelado a 70 °C/7 s (36,9%) e na integridade da membrana plasmática (39,8%), comparado a taxa de descongelamento de 37 °C/2 min. (31,5% e 33,7% de motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática, respectivamente) ou 40 °C/20 s (32,4% e 33,5% de motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática, respectivamente). Assim, é possível que haja uma interação entre o volume da palheta e a taxa de descongelamento que promova uma maior taxa de recuperação espermática em caprinos. E, ainda há uma carência de estudos correlacionando estas variáveis na espécie.

Atenção deve ser dada à temperatura e ao tempo de descongelamento, onde em temperaturas maiores que 37 °C o tempo torna-se uma variável crítica, e estas altas temperaturas podem resultar em elevadas taxas de mortalidade espermática se aplicadas imprópriamente (PURDY, 2006).

### 1.9 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR TEMPO FIXO

Atualmente, a inseminação artificial em caprinos com sêmen fresco tem se tornado uma técnica freqüente comparativamente ao sêmen congelado, tornando o uso comercial deste tipo de sêmen relativamente limitado (BATISTA et al., 2009). Isso porque, como em outras espécies domésticas, o processo de congelamento reduz a viabilidade do sêmen caprino, e, a taxa de nascimentos após IA com sêmen congelado varia entre 30 e 70% (RITAR et al., 1983; LEBOEUF et al., 2003; DORADO et al., 2007), enquanto que para o sêmen fresco ou resfriado esses valores sobem para 60 a 80% (RITAR et al., 1983; ROCA et al., 1997; PAULENZ et al., 2005).

A sincronização do estro e da ovulação utilizando esponjas liberadoras de progesterona ou progestágenos (acetato de medroxiprogesterona - MAP) consiste em uma

ferramenta útil na otimização do manejo reprodutivo de caprinos, já que ela permite a programação dos nascimentos para a época mais favorável do ano, quando falta o produto no mercado ou quando a forragem encontra-se disponível (BATISTA et al., 2009). O tratamento de sincronização rotineiramente utilizado consiste na introdução de esponjas vaginais durante 11 dias, com a aplicação intramuscular de prostaglandina e gonadotrofina coriônica equina (eCG) dois dias antes da remoção da esponja (CORTEEL et al., 1988; LEBOEUF et al., 2003; BATISTA et al., 2009). Tal tratamento induz eficientemente a sincronização do estro e da ovulação tanto durante a estação reprodutiva quanto na contra-estação. As taxas de fertilidade após uma IA realizada 43 horas após a remoção da esponja alcançam valores entre 60 e 65% (CORTEEL et al., 1988; LEBOEUF et al., 2003).

A inseminação artificial em caprinos pode ser realizada com a deposição do sêmen na vagina (apesar de não terem sido encontrados relatos dessa prática no Brasil), na cérvix e no útero pela via laparoscópica (NEVES et al., 2008). Com a inseminação intracervical, uma baixa proporção de espermatozoides atravessa o canal cervical, o que indica que um número relativamente alto de células espermáticas é necessário para obter taxas razoáveis de prenhez (GACITUA; ARAV., 2005). E, diferentes estudos têm observado este fato como um obstáculo na inseminação artificial de pequenos ruminantes (GACITUA; ARAV, 2005; KAABI et al., 2006). Já a inseminação intrauterina por via laparoscópica em caprinos resulta em maiores taxas de fertilidade (EPPELSTON, et al., 1994). Apesar disto, os altos custos associados a esta técnica e a necessidade de inseminadores qualificados são fatores restritivos no uso da laparoscopia para inseminar caprinos (BATISTA et al., 2009).

## 1.10 OBJETIVOS

### 1.10.1 Geral

Avaliar o efeito de diferentes capacidades de palhetas, taxas de descongelação e crioprotetores sobre a qualidade do sêmen caprino descongelado.

### 1.10.2 Específicos

Avaliar a interação entre a capacidade das palhetas de 0,25 e 0,5 mL e as taxas de descongelamento de 37 °C/1 min. e 55 °C/7 s e seu impacto sobre a qualidade do sêmen caprino descongelado;

Analisar separadamente os fatores capacidade de palheta e taxa de descongelamento que produzam maior taxa de recuperação espermática após a criopreservação;

Realizar a análise computadorizada do sêmen caprino congelado-descongelado, utilizando-se os crioprotetores glicerol e dimetilformamida;

Avaliar a fertilidade de cabras inseminadas com sêmen congelado diluído em Tris-gema (2,5%) acrescido de glicerol ou dimetilformamida.

### 1.11 REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 89, p. 105-113, 2005.

AMANN, R. P. Cryopreservation of sperm. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). **Encyclopedia of Reproduction**. Burlington: Academic press, p.773-783, 1999.

AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflexions on CASA after 25 years. **J. Androl.**, v. 25, p. 317-325, 2004.

ASWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K.; FULLER, B.J. (Eds.). **Temperature and Animal Cells**. Cambridge: Biologists Ltd. p. 395-406, 1987.

AZERÊDO, Z. A., ESPER, C. R., RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Rum. Res.**, v. 41, p. 257-263, 2001.

AZEVEDO, D. M. M. R.; TONIOLLI, R. Seminal characteristics of marota bucks in the northeast of Brazil. **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 12, n. 1/3, p. 127-130, 2005.

BATISTA, M.; NIÑO, T., ALAMO, D.; CASTRO, N.; SANTANA, M.; GONZÁLEZ, F.; CABRERA, F.; GRACIA, A. Successful artificial insemination using semen frozen and

stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. **Theriogenology**, v. 71, p. 1307-1315, 2009.

BALL, B.A., VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J. Androl.**, 22, p. 1061-9. 2001.

BEARDEN, H. J.; FUQUAY, J. W. **Applied animal reproduction**. New Jersey: Prentice-Hall, 1992. 478 p.

BIANCHI, I; CALDERAM, K.; MASCHIO, É. F.; MADEIRA, E. M.; ULGUIM, R. R.; CORCINI, C. D.; BONGALHARDO, D. C.; CORRÊA, É. K.; LUCIA Jr. T.; DESCHAMPS, J. C.; CORRÊA, M. N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 632-638, 2008.

BLOM, E. A one minute live dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertil. Steril.**, v. 1, p. 176-177, 1950.

CABRERA, F., GONZÁLEZ, F., BATISTA, M., CALERO, P., MEDRANO, A.; GRACIA, A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary Buck (*Capra hircus*). **Reprod. Dom. Anim.**, v. 40, p. 191-195, 2005.

CASTELO, T. S., FROTA, T. R., SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Vet. Bras.**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991. 222 p.

CHOE, C. Y., KIM, J. G., CHO, S. R., SON, D. S., KIM, Y. K. BALASUBRAMANIAN, S., CHOE, S. Y., RHO, G. J. Influence of Seasons, Extenders, Slow and Rapid Freezing on Seminal Characters in Korean Native Bucks. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 41, p. 55-60, 2006.

COGNIÉ Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v. 59, p. 171-188, 2003.

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

CORTÉS, S.; NUÑEZ, R.; VÁZQUEZ, I. Capacidad de reaccion a endosmosis del espermatozoide de macho cabrio. In: 5º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5, 1993. **Anais...** Portugal: Comunicações livres, 1993. p. 224-230.

CORTEEL, J. M.; LEBOEUF, B.; BARIL, G. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. **Small Rum. Res.**, v. 1, p. 19-35, 1988.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, p. 860-867, 2006.

DEKA, B. B.; RAO, A. R. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. **Ind. Vet. J.**, v. 64, p. 591-594, 1987.

DORADO, J.; HIDALGO, M.; MUÑOZ, A.; RODRÍGUEZ, I. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 112, p. 150-157, 2009.

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

EPPLESTON, J.; SALAMON, S.; MOORE, N.; EVANS, G. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 36, p. 211-25, 1994.

EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of semen. In: **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Wellington: Butterworths, 1987, pp. 122-141.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editora Acribia S. A., 1990. 192 p.

FAHY, G.M. Analysis of solution effects injury—equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl–dimethylsulfoxide–water and NaCl–glycerol–water. **Biophys. J.**, v. 32, p. 837–850, 1980.

FILGUEIRA, T. M. B.; AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D.; SOUZA, W. J.; FONSECA, Z. A. A. S. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na região da chapada do apodi. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v. 4, n. 2, p. 64 – 67, 2009.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005a, p. 1-9.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D. F.; RODRIGUES, M.T.; OLIVEIRA, R.F.M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Anim. Reprod.**, v. 2, n. 2, p. 139-144, 2005b.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **Cryo. Lett.**, v. 25, p. 375-388, 2004.

GACITUA, H; ARAV, A. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 931–8, 2005.

GIBBONS, A. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus**, v. 4, n. 16, p. 24-32, 2002.

GILMORE, J. A.; McGRANN, L. E.; LIU, J.; GAO, D. Y.; PETER, A. T.; KLEINHANS, F. W.; CRITSER, J. K. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 53, p. 985-995, 1995.

GRAVANCE, C. G.; WHITE, C.; ROBERTSON, K. R.; CHAMPION, Z. J.; CASEY, P. J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 49, p. 37–43, 1997.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª ed. São Paulo: Manole. 2004.

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

HAN, B.; BISCHOF, J. C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. **Cryobiology**, v. 48, n. 1, p. 8-21, 2004.

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

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Effects of cooling, freezing and glycerol addition on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **J. Reprod. Fertil.**, v. 51, p. 99-108, 1997.

KAABI, M.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; CHAMORRO, C.; BOIXO, J. C.; PAZ, P., ANEL, L. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. **Theriogenology**, v. 66, p. 1876-83, 2006.

KAROW, A. M. **Cryobiology 2001 for mammalian embryologists**. Georgia, USA: Augusta, 2001. p. 1-37.

KAZDROWSKI, R.; DUBIEL, A.; BIELAS, W.; DZIECIOL, M. Two protocols of cryopreservation of goat semen with the use of computer-assisted semen analysis system. **Acta Vet. Brno.**, v. 76, p. 601-604, 2007.

JOHNSON, M. S.; SENGER, P. L.; ALLEN, C. H.; HANCOCK, D. D.; ALEXANDER, B. M.; SASSER, R. G. Fertility of bull semen packaged in .25 and .5-milliliter French straws. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 1914-1919, 1995.

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

KOZDROWSKI, R., DUBIEL, A., BIELAS, W., DZIECIOL, M. Two Protocols of Cryopreservation of Goat Semen with the Use of Computer-Assisted Semen Analysis System. **Acta Vet. Brno**, 76: 601-604, 2007

LEBOEUF, B.; FORGERIT, Y.; BERNELAS, D.; POUGNARDA, J. L.; SENTYA, E.; DRIANCOURT, M. A. Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus,

time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, p. 1371–1378, 2003.

LEBOEUF, B., RESTALL, B., SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 113–141, 2000.

LIMA, R. A. S. Distribuição do rebanho caprino no Brasil nos anos 1995/96 e 2006. In.: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia. Rio Branco, XLVI, 2008. **Anais...** Acre: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008. p. 1-10.

**MANUAL** para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª ed. Belo Horizonte, CBRA, 1998.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, v. 19, p. 61-72, 1995.

MEDEIROS, A. A. **Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para avaliação da morfologia do espermatozóide ovino.** 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

McPHAIL, D. B.; GOODMAN, B. A. Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems. **Bioch. J.**, v. 221, p. 559-560, 1984.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v. 168, p. 939–949, 1970.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 247, p. 125-142, 1984.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais.** 6ª ed. Porto Alegre: Sulina. 1987.

MOCÉ, E.; VICENTE, J. S.; LAVARA, R. Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 60, p. 115-123, 2003.

NEVES, J. P.; NUNES, J. F.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; SALGUEIRO, C. C. M.; ALMEIDA, J. L. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca. 2008. 395 p.

NOGUEIRA, E. A.; MELLO, N. T. C. **Diagnóstico sócio-econômico da caprinocultura no sudoeste paulista**. Informações Econômicas, São Paulo, v. 35, n. 8, 2005. Disponível em: <<http://www.caprítec.com.br/artigos.htm>>. Acesso em 10/09/2009.

NUNES, J. F. Inseminação artificial em caprinos. In: GONÇALVES P. B. D., FIGUEIREDO J. R., FREITAS V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela. 2002. 340 p.

NUNES, J. F.; CORTEEL, J. M.; COMBARNOUS, Y.; BARIL, G. Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïes de bouc. **Reprod. Nutr. Dév.**, v. 22, p. 611-620, 1982.

OLAR, T. T.; BECKER, W. C.; SENGER, P. L. Effects of thawing rate and cold post-thaw temperatures on bovine semen packaged in glass ampules. **J. Anim. Sci.**, v. 44, p. 95-101, 1977.

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; MOURA, A. A. A. M.; ARAÚJO, A. A. Avaliação morfológica de espermatozoides 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. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 862-869. 2009.

OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T.; KAMIJO, S. I.; KASHIWAZAKI, N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. **Exp. Anim.**, v. 56, p. 29-34, 2007.

PAULA, N. R. O.; CARDOSO, J. F. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; FREITAS, V. J. F. Embriões caprinos produzidos in vivo ou in vitro: técnicas, problemas e perspectivas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 32, n. 1, p. 21-35, 2008.

PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; SOLTUN, K.; SAETHER, P. A.; FJELLOSOY, K. R.; ANDERSEN BERG, K. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 86, p. 109-117, 2005.

PEDROSA, K. Y. F.; BARRÊTO Jr., R. A.; COSTA, E. S.; LEITE, A. I.; PAULA, V. V. P. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na zona noroeste do Rio Grande do Norte. **Caatinga**, v. 16, n. 1/2, p. 17-21, 2003.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A.. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 5, p. 534-543, 2000.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rumin. Res.**, v. 63, p. 215–225, 2006.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca. 2008. 395 p.

RITAR, A. J. Control of ovulation, storage of semen, and artificial insemination of fibre-producing goats in Australia: a review. **Aust. J. Exp. Agr.**, v. 33, p. 807–820, 1993.

RITAR, A. J.; BALL, P. D.; O'MAY, P. J. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 2, p. 377–384, 1990a.

RITAR, A. J.; BALL, P. D.; O'MAY, P. J., Examination of methods for the deep freezing of goat semen. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 2, n. 27–34, 1990b.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 36, p. 49-59, 1983.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J. A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Grandina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. **Small Rum. Res.**, v. 25, p. 147-53, 1997.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, n. 179, p.318–319, 1957.

SANTIAGO-MORENO, J.; COLOMA, M. A.; DORADO, J.; PULIDO-PASTOR, A.; GÓMEZ-GUILLAMON, F.; SALAS-VEGA, R.; GÓMEZ-BRUNET, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. **Theriogenology**, v. 71, p. 1253-1260, 2009.

SALVIANO, M. B., SOUZA, J. A. T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 12, n. 3, p. 159-167, 2008.

SEAPA - SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Superintendência de Economia Agrícola. Caprinos. Belo Horizonte, 2006.

SIMPLÍCIO, A. A.; WANDER, A. E.; LEITE, E. R.; LOPES, E. A. **A caprinoovinocultura de corte como alternativa para a geração de emprego e renda**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2003. 44 p

SIMPLÍCIO A. A.; FREITAS, V. J. F.; SANTOS, D. O. Biotécnicas da Reprodução em Caprinos. **Rev. Ciênc. Agrár.**, n. 43, 2005. Suplemento.

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

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

SOUSA, J. P. F.; BARBAS, J. P.; FERREIRA, G. M. B. C.; HORTA, A. E. M. Variação anual das características seminais em bodes da raça Serrana. **Rev. Port. Zootec.**, pp. 297-311, 2001.

TONER, R.; CRAVALHO, E. G.; KAREL, M. Cellular response of mouse oocytes to freezing stress: prediction of intracellular ice formation. **J. Biomech. Eng.**, v. 115, p. 169-174, 1993.

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

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149–79, 2002.

VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRON, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 68, p. 201-218, 2001.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

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

## 2 CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A CAPACIDADE DA PALHETA E A TAXA DE DESCONGELAÇÃO E SEU IMPACTO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CAPRINO DESCONGELADO *IN VITRO*

### 2.1 RESUMO

No presente estudo, avaliou-se a interação entre diferentes capacidades de palheta e taxas de descongelação sobre os parâmetros do sêmen caprino descongelado. Vinte e um ejaculados (sete por animal) foram coletados por meio de vagina artificial em três bodes. Imediatamente após a coleta, as características macro e microscópicas do sêmen foram avaliadas. O sêmen foi diluído em meio à base de Tris-gema de ovo (2,5%) a uma concentração final de  $150 \times 10^6$  espermatozoides/mL e envasado em palhetas de 0,25 e 0,5 mL, sendo posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido. A descongelação foi realizada usando-se dois diferentes protocolos: 37 °C/1 min. e 55 °C/7 s. Interações entre a capacidade da palheta e a taxa de descongelação promovendo melhores características seminais pós-descongelação não foram verificadas ( $P > 0,05$ ). Entretanto, quando essas variáveis foram analisadas isoladamente, a palheta de 0,5 mL gerou melhor conservação dos parâmetros cinemáticos que a palheta de 0,25 mL após a descongelação ( $P < 0,05$ ), enquanto não foi observada diferença estatística para os parâmetros seminais avaliados entre as taxas de descongelação testadas. Em conclusão, o sêmen caprino deve ser envasado em palhetas de 0,5 mL e descongelado em qualquer taxa de descongelação avaliada neste estudo para uma melhor preservação da motilidade após a descongelação.

**Palavras-Chave:** Capacidade da palheta, caprino, criopreservação, sêmen, taxa de descongelação.

### 2.2 INTRODUÇÃO

A criopreservação como técnica de conservação do sêmen caprino permite a manutenção de um banco de material genético por período indeterminado. Tal técnica apresenta a vantagem de auxiliar no controle de doenças venéreas e ainda resulta em ganhos econômicos para o caprinocultor, quando associada à inseminação artificial. Contudo, os processos de congelação e descongelação do sêmen induzem danos bioquímicos, funcionais e ultra-estruturais aos espermatozoides (WATSON, 2000), resultando em redução da motilidade, integridade de membrana e capacidade de fertilização (PURDY, 2006). Vários estudos sobre o processamento, congelação e descongelação de espermatozoides caprinos vêm sendo conduzidos visando à redução das crioinjúrias (TULI et al., 1991; CHOE et al., 2006; DORADO et al., 2007).

Muitos fatores como a taxa de congelação (CHEMINEAU et al., 1991), o diluente (HASHEMI et al., 2007), o crioprotetor (LOPES et al., 2009), a taxa de diluição (EVANS; MAXWELL, 1987, RITAR et al., 1990a) e o método de envase (MAXWELL et al., 1995; PAULENZ et al., 2004) afetam a qualidade do sêmen descongelado de diferentes espécies. Entretanto, o envase do sêmen caprino em palhetas de 0,25 e 0,50 mL parece não afetar a motilidade espermática após a descongelação (RITAR et al., 1990b).

A taxa de descongelação é outro importante fator que afeta os parâmetros seminais (TULI et al., 1991). Tradicionalmente, palhetas de sêmen caprino são descongeladas em banho-maria a 37 °C durante 12 a 30 s (CABRERA et al., 2005; PURDY, 2006), enquanto que protocolos lentos de descongelação (5 °C/2 min.) promovem menor eficiência (DEKA; RAO, 1987). TULI et al. (1991) observaram um aumento significativo da motilidade progressiva do sêmen caprino descongelado a 70 °C/7 s, comparado à taxa de descongelação de 37 °C/2 min. ou de 40 °C/20 s.

Muitos estudos têm sido conduzidos em suínos (ERIKSSON; RODRIGUEZ-MARINEZ, 2000), peixes (RICHARDSON et al., 2000), ovinos (PAULENZ et al., 2004) e cães (NÖTHLING; SHUTTLEWORTH, 2005) para avaliar a influência dos diferentes métodos de envase e das taxas de descongelação sobre a taxa de sobrevivência espermática. Apesar desse fato, ainda há uma carência de informações da influência das variáveis supracitadas sobre o sêmen caprino. E, uma interação entre a taxa de descongelação e o volume da palheta que promovesse uma maior taxa de recuperação espermática poderia ser detectada para o aprimoramento do processamento do sêmen nesta espécie. Dessa forma, o

presente estudo objetivou avaliar a interação entre diferentes capacidades de palheta e taxas de descongelamento e seu impacto sobre a qualidade do sêmen caprino descongelado.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3.1 Composição do grupo experimental

Três bodes saudáveis e sexualmente maduros, com aproximadamente dois anos de idade foram utilizados. Os animais, um da raça Savana e dois da raça Boer, eram criados sob manejo extensivo em uma propriedade localizada na zona rural de Mossoró, RN (5° 11' de latitude sul e 37° de longitude oeste, com altitude média de 16 m). Dois dias antes da coleta de sêmen, os caprinos foram separados das fêmeas e mantidos em um piquete coberto com telhas de cerâmica. O experimento foi conduzido no período de maio a junho de 2009.

### 2.3.2 Coleta de sêmen

Em torno de um mês antes do início do experimento, os bodes foram condicionados ao procedimento de coleta de sêmen por meio de vagina artificial (43 °C) conectada a um tubo graduado de vidro, usando-se uma fêmea estrogenizada como manequim (SILVESTRE et al., 2004). Cada bode foi coletado duas vezes por semana. Imediatamente após a coleta, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 37 °C até a completa realização de sua avaliação, conduzida em aproximadamente 15 min. Somente as amostras com no mínimo 80% de motilidade progressiva foram criopreservadas. Um total de 21 ejaculados (sete por animal) foi utilizado neste experimento.

### 2.3.3 Avaliação seminal

A cor, o aspecto e o volume do sêmen fresco foram avaliados. Os parâmetros microscópicos, como motilidade progressiva (%) e motilidade massal (escala de 0 - 5) foram analisados subjetivamente através de microscopia óptica (Nikon, Eclipse E200, Tóquio, Japão) sob aumento de 100 x. A porcentagem de espermatozóides vivos foi determinada através de coloração de azul de bromofenol e posterior contagem de 200 células/lâmina sob microscopia óptica (aumento de 400x). A concentração espermática foi determinada através da diluição de 10 µL em 2 mL de solução salina formolizada a 10%, onde uma alíquota do sêmen diluído foi contada com o auxílio de câmara de Neubauer e o resultado expresso em espermatozóides  $\times 10^6 \times \text{mL}^{-1}$ . A morfologia foi avaliada através de esfregaço úmido preparado com rosa de bengala, onde se procedeu a contagem de 200 células em campos aleatórios sob microscopia óptica (aumento de 1000 x). As anormalidades espermáticas foram registradas e classificadas em alterações primárias e secundárias, conforme descrito por NJENGA et al. (1999). A integridade acrossomal também foi avaliada. Para a avaliação da integridade da membrana espermática, o teste hiposmótico (HOST) foi realizado usando-se uma solução de citrato de sódio e frutose a 100 mOsm/L. Procedeu-se a contagem de 200 células sob microscopia de contraste de fase (aumento de 400 x) e os espermatozóides com cauda enrolada foram considerados portadores de membrana funcional (FONSECA et al., 2005).

#### **2.3.4 Processamento e acondicionamento do sêmen**

Um diluente a base de 3,028 g de Tris-hidroximetil-aminometano, 1,78 g de ácido cítrico monohidratado e 1,25 g de D-frutose, dissolvido em 100 mL de água destilada foi utilizado (SIQUEIRA et al., 2009). O diluente apresentou osmolaridade de 295 mOsm/L e pH 6,6. Posteriormente, 2,5% desta solução foram substituídos por gema de ovo.

O sêmen foi inicialmente diluído em Tris-gema de ovo a temperatura ambiente de 32 °C e avaliado quanto à motilidade progressiva. As amostras diluídas foram acondicionadas em uma caixa isotérmica de poliestireno para transporte ao laboratório. Após 40 min., a temperatura da caixa isotérmica atingiu 15°C (- 0,3 °C/ min.) e as amostras foram transferidas para o refrigerador por mais 30 min. Após a refrigeração, o sêmen foi acrescido de Tris-gema adicionado de glicerol a uma concentração final de 6% e avaliado quanto à motilidade

progressiva mais uma vez. Essa diluição final resultou em uma concentração espermática de  $150 \times 10^6$  espermatozoides/mL. As amostras foram envasadas em palhetas plásticas de 0,5 e 0,25 mL previamente identificadas. As palhetas foram dispostas horizontalmente em uma rampa de congelação a uma altura de 5 cm do nível de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), alcançando temperatura aproximada de - 70 °C pela exposição ao vapor. Finalmente, as palhetas foram armazenadas em N<sub>2</sub> até o dia da descongelação (SUNDARARAMAN; EDWIN, 2008).

### **2.3.5 Descongelação das palhetas**

As palhetas foram removidas do N<sub>2</sub> e descongeladas sete dias após a congelação. Tanto palhetas de 0,25 quanto as de 0,5 mL de cada amostra foram descongeladas em banho-maria a 37 °C/1 min., bem como a 55 °C/7 s, seguindo-se mais 30 s a temperatura de 37 °C. As palhetas foram removidas do banho-maria, secadas, cortadas e seu conteúdo transferido para um tubo de ensaio previamente aquecido a 37 °C. As amostras de sêmen foram imediatamente avaliadas para os seguintes parâmetros: motilidade progressiva, porcentagem de espermatozoides vivos, morfologia, integridade acrossomal e integridade de membrana.

### **2.3.6 Análise estatística**

Vinte e uma amostras foram analisadas para cada tratamento. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro-padrão (E.P.). Os dados foram checados para normalidade através do teste de Shapiro-Wilk e para homoscedasticidade através do teste de Lavene, usando o procedimento de variância do *Statistical Analysis System* (SAS 6.10, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para avaliar o efeito dos diferentes fatores e suas interações sobre as variáveis consideradas neste estudo, os dados foram submetidos à análise de variância, usando o *General Linear Model* (GLM). Comparação entre os diferentes tratamentos sobre os parâmetros seminais foram analisados pelo teste de Tukey. Para todas as análises estatísticas, foi considerada uma diferença significativa da ordem de 5%.

## **2.4 RESULTADOS**

#### 2.4.1 Características do sêmen fresco e diluído

O sêmen caprino fresco apresentou coloração amarelada e aspecto leitoso. O volume total dos ejaculados foi de  $1,1 \pm 0,4$  mL, com uma concentração de  $2.400 \pm 1.000 \times 10^6$  espermatozóides/mL. A motilidade progressiva do sêmen fresco foi de  $94,9 \pm 1,7\%$ , e a motilidade massal foi  $3,9 \pm 0,1$ . Um total de  $92,7 \pm 2,0\%$  de espermatozóides vivos,  $76,1 \pm 1,8\%$  de espermatozóides com morfologia normal,  $99,8 \pm 0,1\%$  de espermatozóides com acrossoma intacto e  $30,8 \pm 2,0\%$  com membrana funcional foi observado. O total de anormalidades espermáticas foi de  $23,9 \pm 1,7\%$ , sendo destes  $0,4 \pm 1,2 \%$  classificados em alterações primárias e  $23,5 \pm 1,7\%$  em alterações secundárias. O sêmen diluído apresentou  $93,8 \pm 1,7\%$  de motilidade progressiva, enquanto após o processo de resfriamento e glicerolização, observou-se uma redução significativa para  $70,5 \pm 1,7\%$  ( $P > 0,05$ ).

#### 2.4.2 Características do sêmen descongelado

Os dados para as características do sêmen descongelado estão demonstrados na Tabela 1. O processo de criopreservação afetou significativamente a motilidade progressiva e a porcentagem de espermatozóides vivos ( $P < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre o sêmen fresco e os tratamentos (capacidade da palheta e taxa de descongelação) para os dados de integridade acrossomal e alterações primárias ( $P > 0,05$ ). Entretanto, um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) foi identificado para os dados de anormalidade e alterações secundárias em todos os tratamentos comparados ao sêmen fresco. Além disso, uma redução da integridade de membrana no sêmen envasado em palhetas de 0,25 mL foi observada ( $P < 0,05$ ). Não foram verificadas interações entre as capacidades das palhetas e as taxas de descongelação estudadas ( $P > 0,05$ ).

Tabela 1 – Valores médios ( $\pm$  E.P.) das características do sêmen caprino congelado envasado em palhetas de 0,25 e 0,5 mL e descongelado a taxas de 37 °C/1 min. ou 55 °C/7 s.

Parâmetros seminais	Sêmen	0,25 mL		0,50 mL	
	fresco	37°C/1 min	55°C/7 s	37°C/1 min	55°C/7 s
Motilidade progressiva (%)	94,9 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	32,2 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	30,4 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	36,3 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	37,2 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>
Nº de espermatozóides vivos (%)	92,7 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	16,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	17,2 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	15,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	15,6 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>
Integridade de membrana (%)	30,8 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	22,8 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	21,6 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	23,4 $\pm$ 1,9 <sup>ab</sup>	24,1 $\pm$ 2,0 <sup>ab</sup>
Nº de espermatozóides normais (%)	76,1 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	62,4 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	65,4 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	60,9 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	63,4 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>
Anormalidades (%)	23,9 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	37,6 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	34,6 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	39,1 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	36,6 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>
Alterações primárias (%)	1,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
Alterações secundárias (%)	22,9 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	36,4 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	33,5 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	37,7 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	35,4 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>
Integridade acrossomal (%)	99,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	99,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	99,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	99,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	99,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Na mesma linha, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

### 2.4.3 Efeitos isolados das palhetas e das taxas de descongelção

Quando os dados foram agrupados de acordo com a taxa de descongelção, não foram observadas diferenças para todos os parâmetros avaliados em relação ao sêmen descongelado a 37 °C/1 min. e a 55 °C/7 s ( $P > 0,05$ ). Por outro lado, quando se comparou o efeito isolado da capacidade da palheta, a motilidade progressiva foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) no sêmen envasado em palhetas de 0,5 mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios ( $\pm$  E.P.) para os parâmetros avaliados no sêmen caprino descongelado comparando o efeito isolado das taxas de descongelção e das capacidades da palheta.

Parâmetros Seminais	Taxa de descongelção*		Capacidade da palheta	
	37 °C/1 min	55 °C/7 s	0,25 mL	0,50 mL
Motilidade progressiva (%)	34,3 $\pm$ 1,4	34,1 $\pm$ 1,5	31,4 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	36,9 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>
Nº de espermatozóides vivos (%)	16,0 $\pm$ 1,4	17,0 $\pm$ 1,5	17,1 $\pm$ 1,5	15,9 $\pm$ 1,4
Integridade de membrana (%)	23,2 $\pm$ 1,3	22,7 $\pm$ 1,3	22,4 $\pm$ 1,3	23,5 $\pm$ 1,3
Nº de espermatozóides normais (%)	61,6 $\pm$ 0,1	64,2 $\pm$ 1,0	63,7 $\pm$ 1,0	62,1 $\pm$ 1,0
Anormalidades (%)	38,4 $\pm$ 0,1	35,8 $\pm$ 1,0	36,3 $\pm$ 1,0	37,9 $\pm$ 1,0
Alterações primárias (%)	1,2 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1

Alterações secundárias (%)	37,2 ± 1,0	34,6 ± 1,0	35,1 ± 1,0	36,6 ± 1,0
Integridade acrossomal (%)	99,6 ± 0,1	99,4 ± 0,1	99,4 ± 0,1	99,6 ± 0,1

\* Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre as taxas de descongelamento.

<sup>a,b</sup> Na mesma linha, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

## 2.5 DISCUSSÃO

Uma redução significativa na motilidade progressiva foi verificada desde a diluição do sêmen até a glicerolização. Está claro que o resfriamento causa redução da motilidade espermática, enquanto o glicerol induz danos estruturais e osmóticos que podem resultar em menores valores dos parâmetros cinemáticos do sêmen caprino (SUNDARARAMAN; EDWIN, 2008). Os baixos valores encontrados para a integridade de membrana no sêmen fresco sugerem que o HOST não é a melhor opção para a avaliação desse parâmetro em caprinos. FONSECA et al. (2005) testaram dez soluções hiposmóticas com osmolaridades variando entre 50 e 300 mOsm/L para avaliar a integridade de membrana no sêmen caprino fresco e também encontraram valores menores que 50% para integridade de membrana. Desta feita, estudos adicionais devem ser conduzidos para o desenvolvimento de um método eficiente de avaliação da integridade de membrana nesta espécie e o uso de corantes fluorescentes representa uma boa alternativa (SILVA et al., 2006).

Além disso, a avaliação da porcentagem de espermatozoides vivos após a descongelamento apresentou-se comprometida, uma vez que o processo de criopreservação causa alterações na estrutura da membrana plasmática do espermatozóide e a técnica de coloração através do azul de bromofenol é baseada na permeabilidade da membrana. A criopreservação causa a mudança de fase dos fosfolípidos da membrana do espermatozóide (WOELDERS, 1997). Esta vulnerabilidade é devida ao fato de os lípidos e proteínas na membrana não serem covalentemente ligados e poderem se mover mais facilmente (PARKS; GRAHAM, 1992). É conhecido que os diferentes lípidos possuem diferentes temperaturas de transição, alguns tipos de lípidos se agregam formando um domínio em gel (congelado), excluindo, assim, outros tipos de lípidos que permanecem no estado líquido cristalino (WOELDERS, 1997; MEDEIROS et al., 2002). As proteínas de membrana também são excluídas por esse domínio em gel e conseqüentemente se encontram em um ambiente

lipídico não-fisiológico (MEDEIROS et al., 2002). Acredita-se que isto impeça a função das proteínas de membrana, que são necessárias para a integridade estrutural e transporte de íons (WATSON, 2000).

No presente estudo não foi verificada uma interação entre os diferentes procedimentos de descongelação e envase em palhetas estudados. No entanto, estes resultados diferem dos encontrados por NÖTHLING e SHULLTLEWORTH (2005) para cães, nos quais uma interação entre a palheta de 0,5 mL e a taxa de descongelação de 70 °C/5 s promoveu maior conservação da qualidade seminal. De acordo com LAHNSTEINER (2000), a taxa de descongelação é um parâmetro crítico para a qualidade do sêmen criopreservado. Este autor preconiza que o procedimento deve ser realizado em altas temperaturas para evitar a recristalização. Os principais danos provocados pelo reaquecimento ocorrem quando os espermatozóides passam através da zona crítica entre - 50 °C a - 15 °C ou até - 5 °C. Outrossim, o espermatozóide sofre estresse osmótico quando a duração da descongelação é insuficiente para o efluxo do excesso de crioprotetores de dentro das células. O espermatozóide torna-se túrgido e lisa devido ao meio se tornar abruptamente diluído pelo derretimento do gelo extracelular (ANDRABI, 2007).

Nem a taxa de descongelação a 37 °C/1 min. nem a 55 °C/7 s produziram uma melhor qualidade do sêmen descongelado ( $P > 0,05$ ) e, por isso, essas taxas pareceram não diferir na promoção de danos aos espermatozóides, provavelmente porque a descongelação a 37°C/1 min. ou 55°C/7 seg. não produz diferenças suficientes na quantidade de grandes cristais de gelo formados durante a recristalização, tão deletérios para os espermatozóides. De fato, diferentes protocolos de descongelação têm sido utilizados por diferentes autores (DEKA; RAO, 1987; TULI et al., 1991; KHALIFA; EL-SAYDY, 2006; SUNDARARAMAN; EDWIN, 2008). Por outro lado, estudos demonstraram que a taxa de descongelação rápida comparada ao processo realizado de forma lenta resulta em uma maior taxa de recuperação espermática para eqüinos, ovinos (WATSON, 1990), bovinos (PACE et al., 1991), caprinos (ERIKSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000) e cães (NÖTHLING; SHUTTLEWORTH, 2005). No entanto, existe um platô na relação entre a taxa de descongelação e a sobrevivência espermática, visto que aumentos de temperatura de descongelação para magnitudes entre 50 e 70 °C não promovem mais elevações da motilidade espermática em bovinos (WOLDERS; MALVA, 1998). Assim, hipotetiza-se que para o sêmen caprino, um platô mais baixo exista e

que temperaturas entre 37 °C e 55° C também não promovam diferenças na qualidade do sêmen descongelado.

A superfície de contato do recipiente de envase do sêmen possui importantes implicações nas taxas de resfriamento, congelação e descongelação do sêmen. O envase do sêmen é também um importante fator por razões práticas, já que ele consiste em um meio de identificação de cada dose de sêmen e ainda, quando adequado, permite um melhor armazenamento no botijão de N<sub>2</sub>, ocupando menor espaço (MAXWELL et al., 1995). O presente estudo demonstrou claramente que o sêmen caprino deve ser envasado e congelado em palhetas de 0,50 mL em detrimento do uso de palhetas de 0,25 mL. O padrão de resfriamento e início da cristalização depende, dentre outros fatores, da capacidade da palheta. A palheta de 0,25 mL apresenta uma maior superfície de contato do que a palheta de 0,5 mL, o que pode elevar a possibilidade de ocorrência de mudanças bruscas na temperatura do sêmen dentro da palheta com o processo de descongelação. Tais mudanças podem comprometer a recuperação de espermatozoides vivos após a descongelação e, assim, reduzir a fertilidade (JONHSON et al., 1995). Os resultados expressos no presente trabalho discordam dos apresentados por RITAR et al. (1990b), que concluíram não haver diferenças entre na motilidade do sêmen caprino descongelado envasado em palhetas de 0,25 (33% de motilidade após a descongelação) ou 0,5 mL (34% de motilidade após a descongelação). Em outro estudo, JONHSON et al. (1995) constataram que tanto o sêmen de touros envasado em palhetas de 0,25 quanto de 0,5 mL promoveram porcentagens de concepção similares.

Apesar dos resultados obtidos no presente estudo, a diferença encontrada para a motilidade progressiva do sêmen envasado em palhetas de 0,25 e 0,5 mL foi de baixa magnitude, e, desta forma, poder-se-ia hipotetizar poucas implicações biológicas sobre a fertilidade total. Por outro lado, se a concentração espermática utilizada nas palhetas de 0,25 e 0,5 mL foi igual, na palheta de 0,5 mL teremos um número total de espermatozoides duas vezes maior que na palheta de 0,25 mL, o que poderia elevar a taxa de fertilidade com uso daquela em testes *in vivo*. Tais observações corroboram o já descrito anteriormente: o sêmen caprino deve ser envasado em palhetas de 0,50 mL para alcançar resultados mais elevados de fertilidade após a descongelação.

## 2.6 CONCLUSÕES

Deste modo, pode-se concluir que não importa se o sêmen caprino envasado em palhetas de 0,25 ou 0,5 mL é descongelado a 37 °C/1 min. ou a 55 °C/7 s, mas o envase deve ser realizado em palhetas de 0,5 mL para alcançar valores mais elevados de motilidade progressiva.

## 2.7 REFERÊNCIAS

ANDRABI, S. M. H. Fundamental Principles of Cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* Bull Spermatozoa. **Int. J. Agr. Biol.**, v. 9, p. 367-369, 2007.

CABRERA, F.; GONZÁLEZ, F.; BATISTA, M.; CALERO, P.; MEDRANO, A.; GRACIA, A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary Buck (*Capra hircus*). **Reprod. Dom. Anim.**, v. 40, p. 191-195, 2005.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. 1991. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp. 115–161.

CHOE, C. Y.; KIM, J. G.; CHO, S. R.; SON, D. S.; KIM, Y. K.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Influence of Seasons, Extenders, Slow and Rapid Freezing on Seminal Characters in Korean Native Bucks. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 41, p. 55–60, 2006.

DEKA, B. B.; RAO, A. R. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. **Ind. Vet. J.**, v. 64, p. 591–594, 1987.

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

ERIKSSON, B. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 63, p. 205-220, 2000.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of semen. In: **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Wellington: Butter-worths, 1987. 122–141 p.,

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D. F.; RODRIGUES, M. T.; OLIVEIRA, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Anim. Reprod.**, v. 2, p. 139-144, 2005.

HASHEMI, A.; FARHOOMAND, P.; PIRMOHAMMADI, R.; NAYEBPOR, M.; RAZZAGHZADEH, S. Effect of extender and thawing methods on post thawing preservation. **J. Anim. Vet. Adv.**, v. 6, p. 1337-1339, 2007.

JOHNSON, M. S.; SENGER, P. L.; ALLEN, C. H.; HANCOCK, D. D.; ALEXANDER, B. M.; SASSER, R. G. Fertility of bull semen packaged in .25 and .5-milliliter French straws. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 1914-1919, 1995.

KHALIFA, T. A. A.; EL-SAYDY, B. E. Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. **Am-Euras J. Agric. & Environ. Sci.**, v. 1, p. 288-293, 2006.

LAHNSTEINER, F. Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. **Aquacult. Res.**, v. 31, p. 245-258, 2000.

LOPES, K. R. F.; COSTA, L. L. M.; LIMA, G. L.; SOUZA, A. L. P.; SILVA, A. R. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v. 72, p. 650-644, 2009.

MAXWELL, W. M. C.; LANDERS, A. J.; EVANS, G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. **Theriogenology**, v. 43, p. 1202-1210, 1995.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 38, p. 327-44, 2002.

NJENGA, M. J.; MUNYUA, S. J. M.; MUTIGA, E. R.; GATHUMA, J. M.; KANG'ETHE, E. K.; BWANGAMOI, O.; MUGERA, G. M.; MITARU, B. N. Semen characteristics of goats with subacute, acute and chronic besnoitiosis : research communication. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 70, p. 18-20, 1999.

NÖTHLING, J. O.; SHUTTLEWORTH, R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 1469-1480, 2005.

PACE, M. M.; SULLIVA, J. J.; ELLIOTT, F. I.; GRAHAM, E. F.; COULTER, G. H. Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in .5mL French straws. **J. Anim. Sci.**, v. 53, p. 693-701, 1981.

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

PAULENZ, H., SÖDERQUIST, L., ÅDNØY, T., NORDSTOGA, A., GULBRANDSEN, B.; BERG, K. A. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. **Theriogenology**, v. 61, p. 1719-1727, 2004.

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

RICHARDSON, G. F.; MILLER, T. I.; McNIVEN, M. A. Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. **Aquacult. Res.**, v. 31, p. 307-315, 2000.

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

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

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M.; CHIRINÉA, V. H.; LOPES, M. D.; SOUZA, F. F. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. **Theriogenology**, v. 66, p. 456-462, 2006.

SILVESTRE, M. A.; SALVADOR, I.; SÁNCHEZ J. P.; GÓMEZ, E. A. Effect of changing female stimulus on intensive semen collection in young Murciano-Granadina male goats. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 1641-1645, 2004.

SIQUEIRA, A. P.; SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H.; PALHARES, M. S.; BORGES, A. M.; BRUSCHI, M. C. M.; PEIXOTO, M. P.; ROSSI, R. Taxa de

concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, p. 66-71, 2009.

SUNDARARAMAN, M. N.; EDWIN, M. J. Changes in motility characteristics of goat spermatozoa during glycerol-equilibration and the relevance to cryopreservation. **Asian J. Cell. Biol.**, v. 3, p. 22-23, 2009.

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

WATSON, P. F. Artificial insemination and the preservation of semen. In: LAMMING, G. **Marshall's Physiology of Reproduction**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990. 747-869 p.

WATSON P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 481-92, 2000.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Vet. Quart.**, v. 19, p. 135-138, 1997.

WOELDERS, H.; MALVA, A. P. How important is the cooling rate in cryopreservation of (bull) semen, and what is its relation to thawing rate and glycerol concentration. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 33, p. 299-305, 1998.

### 3 CAPÍTULO 3 – EFEITOS CRIOPROTETORES DA DIMETILFORMAMIDA NA CONGELAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO: EFICIÊNCIA *IN VIVO* E *IN VITRO*

#### 3.1 RESUMO

Vinte e um ejaculados (sete por animal) foram coletados de três caprinos machos com auxílio de vagina artificial e, imediatamente foram avaliadas as características seminais macro e microscópicas. O sêmen foi diluído em duas etapas com um diluente à base de Tris-gema de ovo contendo uma concentração final de 6% de glicerol ou de DMF, congelado em palhetas de 0,50 mL e armazenado em nitrogênio líquido. Imediatamente após a descongelação, as amostras foram avaliadas subjetivamente para a motilidade e morfologia espermáticas, integridade funcional da membrana, porcentagem de espermatozóides vivos, e objetivamente, usando-se o CASA. Posteriormente, vinte e oito cabras foram inseminadas por tempo fixo: quatorze com sêmen criopreservado com glicerol e quatorze com sêmen acrescido de DMF. Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) foi encontrada entre o sêmen congelado com glicerol e DMF para a motilidade progressiva avaliada subjetivamente ( $23,9 \pm 2,2$  vs.  $16,6 \pm 2,0\%$ ), para a motilidade progressiva avaliada objetivamente ( $3,5 \pm 0,4$  vs.  $1,8 \pm 0,3\%$ ), para a linearidade ( $53,9 \pm 1,6$  vs.  $48,1 \pm 1,4\%$ ) e para a amplitude lateral da cabeça ( $2,3 \pm 0,1$  vs.  $2,9 \pm 0,1$  mm), o que confirma a eficiência do glicerol. Quanto às inseminações artificiais, 42,7% de taxa de prenhez foram encontrados para o grupo do glicerol, enquanto que, no grupo inseminado com DMF, verificou-se uma redução da taxa para 27,3%, mas sem diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Conclui-se que não existem benefícios para a criopreservação do sêmen de caprinos na substituição do crioprotetor glicerol pela dimetilformamida.

**Palavras-Chave:** Criopreservação, crioprotetor, dimetilformamida, glicerol, sêmen caprino.

#### 3.2 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 60 anos se passaram desde o primeiro relato da congelação do sêmen caprino realizada com sucesso (SMITH; POLGE, 1950). Apesar de todo este tempo, a criopreservação de sêmen para esta espécie ainda não é tão eficiente, resultando em decréscimos de aproximadamente 50% na motilidade espermática após a descongelação (AZERÊDO et al., 2001; CHOE et al., 2006; KOZDROWSKI et al., 2007).

Muitos crioprotetores penetrantes (glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol e propilenoglicol) e suas combinações têm sido testadas para o sêmen caprino (RITAR et al., 1990a, b; TULI; HOLTZ, 1994; SINGH et al., 1995; KUNDU et al., 2000; LEBOEUF et al., 2000), todavia, o crioprotetor penetrante mais frequentemente utilizado continua sendo o glicerol (PURDY, 2006). Contudo, o glicerol apresenta-se tóxico aos espermatozoides (HOLT, 2000), podendo também induzir estresse osmótico (PURDY, 2006). A adição do glicerol por si só já gera certos danos estruturais e reduz a motilidade espermática (MAXWELL; WATSON, 1996; SALAMON; MAXWELL, 2000), resultando em menores taxas de fertilidade quando a inseminação artificial é utilizada.

Para eqüinos (ALVARENGA et al., 2005), coelhos (OKUDA et al., 2007) e suínos (BIANCHI et al., 2008) as amidas foram sugeridas como crioprotetores alternativos na congelação do sêmen daqueles indivíduos que apresentaram-se primariamente mais sensíveis aos efeitos tóxicos do glicerol (WATSON, 1995; HAY et al., 1997). Os efeitos crioprotetores das amidas podem ser atribuídos ao seu baixo peso molecular (73,09 g/mol) e viscosidade em relação ao glicerol (peso molecular = 92,05 g/mol), além de sua alta permeabilidade à membrana plasmática, reduzindo assim a possibilidade de causar algum dano celular pelo estresse osmótico (DALIMATA; GRAHAM, 1997; BALL; VO, 2001). Além disso, a adição do radical metil (CH<sub>3</sub>) na molécula das amidas aumenta a permeabilidade dessas substâncias à membrana espermática, e conseqüentemente, a eficiência da ação crioprotetora (BIANCHI et al., 2008).

SILVA et al. (2006) em trabalho com a congelação do sêmen caprino, reportaram que a dimetilformamida (DMF) poderia ser um crioprotetor alternativo viável, tanto isoladamente quanto em associação com o glicerol. No entanto, somente estudos *in vitro* foram realizados de maneira subjetiva. Assim, estudos de avaliação objetiva do sêmen caprino e testes *in vivo* para elucidar os efeitos crioprotetores da DMF nesta espécie são, ainda, necessários. A avaliação da motilidade subjetiva apresenta um valor preditivo de fertilidade limitado. Isto porque esta estimativa subjetiva é afetada consideravelmente pelo observador (VERSTEGEN

et al., 2002). Atualmente, dados quantitativos da análise computadorizada de sêmen (CASA) têm permitido a detecção de súbitas alterações na movimentação, velocidade e morfologia espermáticas, aumentando a acurácia e eficiência da discriminação entre tratamentos nos estudos laboratoriais de novos diluentes, crioprotetores e outros processos (AMANN; KATZ, 2004). Ademais, quando realizados em combinação com testes *in vivo* por meio da inseminação artificial, os testes *in vitro* realmente predizem a qualidade dos crioprotetores, porque os testes *in vivo* e *in vitro* permitem a comparação dos resultados, e, esta associação pode ser facilmente aplicada para qualquer substância que possa afetar as funções espermáticas e/ou para a avaliação da qualidade seminal (AIRES et al., 2003).

Desta forma, o presente estudo objetivou comparar os efeitos do glicerol e da DMF na criopreservação do sêmen caprino, baseando-se nos parâmetros de motilidade após a descongelação e velocidade objetivamente avaliados pelo CASA, nas avaliações subjetivas de motilidade progressiva, na porcentagem de células vivas, na morfologia espermática, na integridade funcional da membrana plasmática, e, por meio da fertilidade *in vivo* após a inseminação artificial.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Animais experimentais

Três bodes saudáveis e sexualmente maduros (com idade aproximada de 2 anos) foram utilizados para a coleta de sêmen, sendo um da raça Savana (Animal A) e dois da raça Boer (Animais B e C). Os animais eram criados em uma propriedade rural de Mossoró/RN (5°11' de latitude sul e 37° de longitude oeste com altitude média de 16 m), sob manejo extensivo, tendo como suporte forrageiro principal a vegetação nativa do tipo caatinga, com livre acesso à água e suplementação com mistura mineral completa. Entretanto, dois dias antes da coleta de sêmen, eles foram mantidos em um curral separados das fêmeas. Para a realização das inseminações artificiais, vinte e oito fêmeas com aproximadamente 3 anos de idade, primíparas ou pluríparas e com boas condições corporais (escore corporal 3), foram selecionadas. O experimento foi conduzido entre os meses de maio e setembro de 2009.

### 3.3.2 Coleta e avaliação inicial do sêmen

Um mês antes do início do experimento, todos os bodes foram treinados para a coleta de sêmen por vagina artificial (43 °C) conectada a um tubo graduado de vidro, usando uma fêmea com estro induzido como manequim (SILVESTRE et al., 2004). O sêmen de cada bode foi coletado duas vezes por semana. Imediatamente após a coleta, os ejaculados foram mantidos imersos em banho-maria a 37 °C e o sêmen foi avaliado em aproximadamente 15 min. Somente aquelas amostras com pelo menos 80% de motilidade progressiva foram selecionadas para a congelação. Ao todo, 21 ejaculados (sete por animal) foram usados neste experimento.

A cor, o aspecto e o volume foram avaliados no sêmen fresco. Critérios microscópicos como motilidade progressiva (%) e motilidade massal (0 - 5) foram avaliados subjetivamente usando-se microscopia de luz (Nikon, Eclipse E200, Tóquio, Japão) sob aumento de 100 x. A porcentagem de espermatozóides vivos foi estabelecida pela análise de uma lâmina corada com azul de bromofenol sob aumento de 400 x em microscópio óptico, contando-se 200 células por lâmina. Após a avaliação inicial, uma alíquota de 10 µL de sêmen foi diluída em 2 mL de solução salina formolizada (10%) para a determinação da concentração espermática (espermatozóides  $\times 10^6 \times \text{mL}^{-1}$ ) com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Para a avaliação da morfologia, 200 espermatozóides de campos aleatórios foram contados em esfregaços úmidos corados com rosa de bengala sob aumento de 1000 x em microscópio óptico. O total de células espermáticas anormais foi contado em 200 células, seguindo-se a classificação em alterações primárias ou secundárias (NJENGA et al., 1999). A integridade acrossomal também foi avaliada. Para a avaliação da integridade funcional da membrana plasmática, um teste hiposmótico (HOST) foi realizado imediatamente após a coleta do sêmen, usando uma solução hiposmótica a base de citrato de sódio e frutose (100 mOsm/L). Um total de 200 espermatozóides foi contado usando-se microscopia de contraste de fase (aumento de 400 x), e, os espermatozóides que apresentavam caudas enroladas foram considerados com membrana funcional (FONSECA et al., 2005).

### 3.3.3 Processamento do sêmen

Um diluente constituído por 3,028 g de Tris-hidroximetil-aminometano, 1,78 g de ácido cítrico monohidratado e 1,25 g de D-frutose, dissolvidos em 100 mL de água destilada foi usado (SIQUEIRA et al., 2009). A osmose desta solução foi de 295 mOsm/L e o pH de 6,6. Dois e meio por cento desta solução foi posteriormente substituída por gema de ovo.

O sêmen foi inicialmente dividido em duas alíquotas e diluído em Tris-gema de ovo à temperatura ambiente (32 °C). As amostras foram colocadas em uma caixa isotérmica de poliestireno expandido e transferidas para o laboratório. Após 40 minutos, a temperatura dentro da caixa isotérmica alcançou 15°C (- 0,30 °C/min) e as amostras foram transferidas para um refrigerador por mais 30 min., quando elas atingiram 4 °C a uma taxa de resfriamento de -0,37 °C/min. Após o resfriamento, uma alíquota de sêmen foi adicionada de Tris-gema de ovo com uma concentração final de 6% de glicerol, enquanto a outra foi acrescida de Tris-gema de ovo com concentração final de 6% de DMF. A diluição final resultou em uma concentração espermática de  $150 \times 10^6$  espermatozoides/mL. As amostras foram envasadas em palhetas plásticas de 0,5 mL previamente identificadas (n = 4), as quais foram dispostas horizontalmente em uma caixa isotérmica por 5 min. a uma altura de 5 cm da lâmina de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), atingindo temperatura próxima de - 70 °C sobre o vapor. As palhetas foram armazenadas em N<sub>2</sub> até o dia da descongelação (SUNDARARAMAN; EDWIN, 2008), na qual as palhetas foram removidas do N<sub>2</sub> e randomicamente descongeladas em banho-maria a 37 °C/1 min. sete dias após a congelação. Finalmente, as palhetas foram removidas, secadas, cortadas e seu conteúdo foi transferido para um tubo de vidro previamente aquecido a 37 °C em banho-maria. As amostras de sêmen foram imediatamente avaliadas para a motilidade progressiva, porcentagem de espermatozoides vivos, morfologia, além de integridade acrossomal e de membrana plasmática.

### **3.3.4 Análise computadorizada de sêmen**

O sêmen descongelado foi também avaliado pelo CASA de acordo com as recomendações de DORADO et al. (2009). Uma alíquota de 10 µL de sêmen foi colocada sobre uma câmara de Makler pré-aquecida a 37°C (Sefi Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel), deixada em repouso por 1 min. e examinada em um sistema de microscopia de

contraste de fase (Olympus BH-2, Tóquio, Japão), com iluminação estromboscópica acoplada a um sistema de vídeo-câmera adaptado para o *Sperm Class Analyzer* (SCA versão 3.2.0; Microptic S.L., Barcelona, Espanha). As configurações do aparelho foram: temperatura a 37 °C; taxa de atualização de 25 telas/s; contraste mínimo de 75; limiar de retidão de 80%; valor mínimo de velocidade média da trajetória (VAP) de 10; e VAP médio de 45. Três campos não consecutivos foram randomicamente selecionados. Os parâmetros analisados foram: número de células contadas, motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade média da trajetória (VAP; mm/s), velocidade linear progressiva (VSL; mm/s), velocidade curvilínea (VCL; mm/s), amplitude lateral da cabeça (ALH; mm), frequência de batimento de cauda (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %) e linearidade (LIN; %).

### **3.3.5 Inseminação artificial e diagnóstico de gestação**

Vinte e oito cabras foram inseminadas por tempo fixo. Os ciclos estrais foram sincronizados usando-se esponjas intravaginais impregnadas com progestágenos (60 mg de acetato de medroxiprogesterona, Progespon<sup>®</sup>, Schering-plough, São Paulo, Brasil) durante 11 dias. Dois dias antes da retiradas das esponjas, as cabras receberam uma injeção intramuscular contendo 200 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG, Foligon<sup>®</sup>, Intervet, Boxmeer, Holanda) e 7,5 mg de um análogo de prostaglandina F<sub>2α</sub> (Veteglan<sup>®</sup>, Calier S.A., Barcelona, Espanha). A inseminação artificial foi realizada sob condições de campo entre 55 e 60 horas após a remoção das esponjas. Através de um espéculo com iluminação, inseriu-se o aplicador de sêmen por via cervical, sendo o sêmen depositado o mais profundo possível no trato genital da fêmea (ANDERSEN et al., 1973). O sêmen dos três bodes foram utilizados para as inseminações, onde 10 cabras foram inseminadas com o sêmen do bode A, 10 cabras com o sêmen do bode B e 8 com o sêmen do bode C. A partir de cada ejaculado, foram realizadas duas inseminações, resultando em quatorze cabras inseminadas com sêmen criopreservado com glicerol, e outras quatorze com sêmen acrescido de DMF. Todas as inseminações foram realizadas pelo mesmo inseminador. A prenhez foi confirmada através de ultrassonografia transretal em tempo real no 38º dia após a inseminação, usando um aparelho portátil em modo-B (485 Anser Ultrasound Scanner Pie Medical, Maastricht, Holanda) equipado com um transdutor linear de frequência variável entre 5,0 e 7,5 MHz (DORADO et al., 2007).

### 3.3.6 Análise estatística

Vinte e uma amostras foram analisadas para cada tratamento. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro-padrão (E.P.). Os dados foram checados para normalidade através do teste de Shapiro-Wilk e para homoscedasticidade através do teste de Lavene, usando o procedimento de variância do *Statistical Analysis System* (SAS 6.10, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os dados sofreram transformação ( $\sqrt{X + 100}$ ) e foram submetidos à análise de variância, usando o *General Linear Model* (GLM). Comparações entre os diferentes crioprotetores sobre os parâmetros seminais foram analisadas pelo teste de Tukey. As diferenças nos resultados de fertilidade entre os grupos experimentais foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Para avaliar o efeito individual dos animais e suas interações com os efeitos dos crioprotetores sobre as variáveis estudadas, os dados foram avaliados pelo teste de Fisher PSLD. Para todas as análises estatísticas, foi considerada uma diferença significativa da ordem de 5%.

## 3.4 RESULTADOS

### 3.4.1 Sêmen fresco e diluído

O sêmen fresco apresentou-se com coloração amarelada e aspecto leitoso. O volume total dos ejaculados foi de  $1,1 \pm 0,1$  mL, com uma concentração espermática de  $2,4 \pm 0,2 \times 10^9$  espermatozoides/mL. A motilidade progressiva do sêmen fresco foi  $95,0 \pm 2,0\%$ , e a motilidade massal  $3,9 \pm 0,2$ . A porcentagem de espermatozoides vivos foi de  $90,7 \pm 3,5\%$ ,  $76,1 \pm 1,7\%$  dos espermatozoides foram considerados morfológicamente normais,  $99,9 \pm 0,1\%$  dos espermatozoides apresentaram acrossoma intacto e  $33,0 \pm 1,8\%$  integridade de membrana. Um total de  $23,9 \pm 1,7\%$  de alterações morfológicas foi encontrado, sendo destes  $0,6 \pm 0,2\%$  classificados como alterações primárias e  $23,2 \pm 1,6\%$  classificados como alterações secundárias. O sêmen diluído apresentou  $93,8 \pm 2,0\%$  de espermatozoides com motilidade progressiva. Imediatamente após a adição do diluente acrescido do crioprotetor a 4

°C, houve uma redução significativa da motilidade progressiva para  $70,5 \pm 2,0$  e  $77,9 \pm 2,0\%$  no sêmen adicionado de glicerol e de DMF, respectivamente ( $P < 0,05$ ).

### 3.4.2 Características do sêmen após a descongelção

Após a descongelção, o sêmen criopreservado com glicerol apresentou motilidade progressiva avaliada subjetivamente significativamente maior que o acrescido de DMF ( $P < 0,05$ ). Todavia, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre esses crioprotetores para a porcentagem de espermatozoides vivos, morfologia, e integridades acrossomal e de membrana (Tabela 3). Os padrões de motilidade espermática avaliados objetivamente (dados do CASA) no sêmen descongelado estão demonstrado na Tabela 4. Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para variáveis avaliadas pelo CASA, incluindo motilidade progressiva, LIN e ALH, foram observadas entre os dois crioprotetores testados. A distribuição de espermatozoides nas quatro subpopulações encontra-se demonstrada na Tabela 5. De maneira geral, o glicerol preservou melhor os parâmetros cinemáticos em relação à DMF. Não foram observados efeitos individuais dos animais e nem interações entre os animais e os crioprotetores com relação a nenhum dos parâmetros avaliados ( $P > 0,05$ ).

Tabela 3 – Valores médios ( $\pm$  E.P.) para os parâmetros subjetivos do sêmen caprino criopreservado com glicerol ou dimetilformamida (DMF) como crioprotetor.

Parâmetro espermático	Glicerol	DMF
Motilidade progressiva (%)	$23,9 \pm 2,2^a$	$16,6 \pm 2,0^b$
Nº de espermatozoides vivos (%)	$13,1 \pm 6,3^a$	$19,4 \pm 5,8^a$
Integridade de membrana (%)	$11,8 \pm 3,2^a$	$11,1 \pm 2,9^a$
Nº de espermatozoides normais (%)	$64,3 \pm 3,1^a$	$67,9 \pm 2,8^a$
Anormalidades (%)	$35,7 \pm 3,1^a$	$32,1 \pm 2,8^a$
Alterações primárias (%)	$0,8 \pm 0,4^a$	$0,6 \pm 0,4^a$
Alterações secundárias (%)	$34,9 \pm 2,9^a$	$31,5 \pm 2,7^a$
Integridade acrossomal (%)	$99,9 \pm 0,2^a$	$99,8 \pm 0,2^a$

<sup>a,b</sup> Na mesma linha, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem ( $P < 0,05$ ).

Tabela 4 – Médias ( $\pm$  E.P.) dos parâmetros de motilidade mensurados pelo CASA para o sêmen caprino descongelado ( $n = 21$ ) e criopreservado usando-se glicerol ou dimetilformamida (DMF) como crioprotetor.

Dados do CASA	Glicerol	DMF
Nº de espermatozóides contados ( $\times 10^3$ )	$1,3 \pm 0,1^a$	$1,2 \pm 0,1^a$
Motilidade total (%)	$18,1 \pm 1,9^a$	$13,4 \pm 1,6^a$
Motilidade progressiva (%)	$3,5 \pm 0,4^a$	$1,8 \pm 0,3^b$
Velocidade curvilínea ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	$36,6 \pm 1,6^a$	$36,4 \pm 1,3^a$
Velocidade linear progressiva ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	$20,0 \pm 1,1^a$	$17,6 \pm 1,0^a$
Velocidade média da trajetória ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	$25,5 \pm 1,3^a$	$23,6 \pm 1,1^a$
Linearidade (%)	$53,8 \pm 1,6^a$	$48,1 \pm 1,4^b$
Retilinearidade (%)	$77,5 \pm 1,0^a$	$75,2 \pm 0,9^a$
Amplitude lateral da cabeça ( $\mu\text{m}$ )	$2,3 \pm 0,1^b$	$2,9 \pm 0,1^a$
Frequência do batimento de cauda (Hz)	$8,8 \pm 0,5^a$	$9,9 \pm 0,4^a$

<sup>a,b</sup> Na mesma linha, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem ( $P < 0,05$ ).

Tabela 5 – Proporção de espermatozóides nas quatro subpopulações espermáticas definidas pelo CASA para o sêmen caprino descongelado usando-se glicerol ou dimetilformamida (DMF) como crioprotetor.

Subpopulação espermática	Glicerol	DMF
Rápida (%)	$2,3 \pm 0,4^a$	$1,6 \pm 0,3^a$
Média (%)	$3,0 \pm 0,3^a$	$1,8 \pm 0,3^b$
Lenta (%)	$12,7 \pm 1,5^a$	$10,0 \pm 1,3^a$
Estática (%)	$82,0 \pm 1,9^a$	$86,6 \pm 1,6^a$

<sup>a,b</sup> Na mesma linha, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem ( $P < 0,05$ ).

### 3.4.3 Taxa de fertilidade

Três cabras do grupo inseminado com sêmen criopreservado com DMF foram excluídas do estudo, visto que elas morreram sem causa conhecida. Assim, 14 cabras foram usadas para a composição do grupo do glicerol e somente 11 compuseram o grupo da DMF.

Uma taxa de fertilidade de 42,7% (6/14) foi observada para o grupo do glicerol. No entanto, não se observou diferença significativa entre este grupo e o inseminado com DMF, onde se verificou taxa de prenhez de 27,3% (3/11) ( $P > 0,05$ ).

### 3.5 DISCUSSÃO

Após a adição dos crioprotetores ao sêmen caprino a 4 °C, a motilidade progressiva avaliada subjetivamente foi melhor preservada com o uso de DMF. Esses resultados são similares aos encontrados por LOPES et al. (2009) no sêmen canino. Sabe-se que a adição do crioprotetor a uma solução pode afetar sua condutividade hidráulica, o que interfere no estresse osmótico ao qual as células estão expostas durante os ciclos de resfriamento e congelação (GILMORE et al., 1995). Isto porque a esta temperatura, a pressão osmótica avaliada após a adição do DMF é menos deletéria ao espermatozóide que àquela causada pelo glicerol (LOPES et al., 2009).

Entretanto, os resultados após a descongelação apontaram que o DMF não deve ser usado como crioprotetor alternativo frente ao glicerol para a congelação do sêmen caprino, assim como, esta amida demonstrou-se incapaz de preservar adequadamente a motilidade subjetiva e parâmetros de velocidade avaliados pelo CASA (motilidade progressiva, LIN e ALH). Esses resultados foram contrários aos previamente relatados para equinos (ALVARENGA et al., 2005), coelhos (OKUDA et al., 2007) e suínos (BIANCHI et al., 2008), todavia, foram similares aos reportados para touros (GONZALEZ, 2004) e cães (LOPES et al., 2008). Para as últimas espécies, foi hipotetizado que há diferenças na susceptibilidade espermática à ação dos crioprotetores, o que pode afetar a adaptação às várias espécies de substâncias, talvez pelas suas condições tóxicas. Foi sugerido, também, que as diferenças entre as espécies na quantidade de fosfolipídeos poderiam interferir na estabilidade da membrana plasmática durante a criopreservação (HAMMERSTED et al., 1990).

Os resultados do presente trabalho também discordam com os apresentados por Silva et al. (2006), que demonstraram que a DMF, usada isoladamente ou em associação com o glicerol, poderia ser uma alternativa viável na criopreservação do sêmen caprino, preservando igualmente a motilidade espermática e o vigor por até 60 min. após a descongelação no teste de termorresistência lento. Além disso, os pesquisadores supracitados somente realizaram

uma avaliação subjetiva, que, de acordo com VERSTEGEN et al. (2002), possui um reduzido valor preditivo de fertilidade, uma vez que se observa uma alta variabilidade (entre 30 e 60%) entre os avaliadores e laboratórios na avaliação subjetiva de motilidade progressiva de um mesmo ejaculado (IGUER-OUADA; VERSTEGEN, 2001). Durante a mensuração subjetiva da motilidade espermática, a célula é geralmente considerada móvel se sua cauda está se movendo, até mesmo se o movimento não for progressivo. Outro problema é a superestimação da motilidade avaliada subjetivamente devido à alta concentração ou velocidade espermática. O sistema de CASA elimina esses erros e esta é a razão pela qual o CASA apresenta valores mais baixos da motilidade massal e motilidade progressiva que os estimados subjetivamente (DAVES; KATZ, 1992). Isto explica a grande diferença entre a avaliação subjetiva e a avaliação pelo CASA para os valores de motilidade progressiva encontrados no presente estudo.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois crioprotetores testados para a porcentagem de espermatozoides vivos, morfologia, integridade acrossomal e de membrana plasmática, o que denota capacidade similar do glicerol e da DMF em preservar esses parâmetros. Contudo, tanto a motilidade progressiva avaliada subjetivamente, quanto objetivamente pelo CASA foi consideravelmente afetada com o uso da DMF. Sabe-se que a motilidade espermática é o componente central na fertilidade do macho devido sua importância na migração pelo trato genital e na interação com o oócito para a fertilização (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006; SUAREZ; PACEY 2006). CHANG et al. (2004) observaram que a exposição continuada ao DMF em humanos é responsável por efeitos tóxicos sobre a função espermática e causa redução na motilidade, isso porque a DMF ou a N-metilformamida, um produto da biotransformação do DMF em humanos, está associada aos efeitos adversos sobre a mitocôndria espermática, porém, como isso acontece ainda não está completamente elucidado. No entanto, sabe-se que a função mitocondrial é um dos fatores etiológicos devidamente reconhecidos na redução da motilidade espermática. A eficácia da propulsão do espermatozóide é primariamente dependente da função mitocondrial; a mitocôndria espermática localiza-se na peça intermediária e distribui a energia requerida para a geração e propagação da onda flagelar. A infertilidade do macho pode resultar de uma redução significativa no número de formas móveis ou de desordens na qualidade do movimento (McLEOD; GOLD, 1951).

A linearidade e o ALH parecem ser indicadores da hiperativação espermática, e, baixos valores de ALH foram associados a falhas na fertilização *in vitro* (JEULIN et al., 1989; MORTIMER, 2000; PEÑA et al., 2000). Além disso, um estudo com sêmen caprino para determinar a correlação entre os parâmetros do CASA e a migração no muco cervical homólogo demonstrou que a linearidade está correlacionada com a eficiência da migração espermática *in vitro*, onde valores de LIN > 50% indicaram uma melhor migração (COX et al., 2006). Destarte, ambos os parâmetros citados podem ser entendidos como preditores de fertilidade em caprinos. Entretanto, o presente estudo demonstrou que dentre os parâmetros avaliados pelo CASA, o glicerol promoveu melhores resultados de linearidade que a DMF, enquanto a DMF produziu maiores resultados de ALH. Estes resultados não estão claros. Assim, investigações adicionais para definir qual desses parâmetros é o mais importante são necessárias. Apesar deste fato, a baixa diferença no ALH encontrada em detrimento dos resultados dos outros parâmetros, faz do glicerol um crioprotetor mais eficiente para preservar também os parâmetros objetivos gerais.

Nos resultados das inseminações artificiais, não foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os dois tratamentos, embora os valores obtidos com o glicerol tenham sido numericamente superiores. Cabe ressaltar que este é o primeiro relato de prenhez obtida com o uso de sêmen congelado com DMF na espécie caprina. Deste modo, assim como para outras espécies, a DMF parece ser um crioprotetor eficaz que promove boas taxas de fertilidade para caprinos. LUKASZEWICZ (2002) trabalhou com sêmen de ganso criopreservado com 6% de DMF e observou que, apesar do processo de congelação afetar a motilidade e a morfologia espermática, não houve efeito na capacidade de fertilização do sêmen. As taxas médias de fertilidade e de eclodibilidade dos ovos foram de 73,87, e 88,17%, respectivamente, mostrando que é possível a aplicação desta técnica de IA com sêmen congelado na prática da criação em substituição à monta natural, ou mesmo para auxiliar o acasalamento natural em períodos de baixa fertilidade. MEDEIROS et al. (2003) inseminaram éguas com sêmen de garanhões considerados “maus congeladores”, obtendo-se taxas de fertilidade de 0% para o sêmen criopreservado com glicerol e de 40% com o uso da DMF. Oliveira et al. (2006) não obtiveram gestação em jumentas (em 53 ciclos) inseminadas com sêmen congelado com diferentes combinações de glicerol, DMF, dimetilacetamida ou dimetilsulfóxido (concentração total de 2 a 5%), apesar da boa motilidade total obtida após a descongelação (60%). Por outro lado, quatro gestações em éguas foram obtidas em 10 ciclos de inseminações

com o sêmen do mesmo jumento, congelado com a combinação de 3% de glicerol e 2% de DMF. Confirmando esses resultados, VIDAMENT et al. (2009) encontraram altas taxas de motilidade após a descongelação para o sêmen de jumento congelado com DMF comparado ao sêmen congelado com glicerol, no entanto, baixas taxas de fertilidade (11%) em jumentas após a inseminação foram relatadas. Dessa forma, os autores concluíram que ao contrário do que ocorre em outras espécies, em jumentos, a motilidade apresenta um baixo valor preditivo de fertilidade. Segundo PURDY (2006), a adição do glicerol pode induzir um estresse osmótico ao espermatozóide, apesar de a extensão dos danos variar de acordo com a espécie. Na espécie caprina, os espermatozóides são razoavelmente tolerantes às condições osmóticas e podem resistir a uma rápida exposição ao glicerol.

### 3.6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, pode-se depreender, com base na análise objetiva realizada pelo CASA que o glicerol preserva melhor os parâmetros seminais *in vitro* que a DMF, entretanto, estes crioprotetores demonstraram-se similares nos testes *in vivo*, quando se faz uso da inseminação artificial. Dessa forma, conclui-se que não existem benefícios para a criopreservação do sêmen de caprinos na substituição do crioprotetor glicerol pela DMF.

### 3.7 REFERÊNCIAS

AIRES, V. A.; HINSCH, K. D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 269-279, 2003.

ANDERSEN, K.; AAMDAL, J.; FOUIGNER, J. A. Intrauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. **Zuchthygiene**, v. 8, p. 113-8, 1973.

ALVARENGA, M.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 89, p. 105–13, 2005.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections of CASA alter 25 years. **J. Androl.**, v. 25, p. 317–25, 2004.

AZERÊDO, Z. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Rum. Res.**, v. 41, p. 257-263, 2001.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J. Androl.**, v. 22, p. 1061–9, 2001.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E. F.; MADEIRA, E. M.; ULGUIM, R. R.; CORCINI, C. D.; BONGALHARDO, É.; CORRÊA, É. K.; LUCIA Jr., T.; DESCHAMPS, J. C.; CORRÊA, M. N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, p. 632–8, 2008.

CHANG, H. Y.; SHIH, T. S.; GUO, Y. L.; TSAI, C. Y.; HSU, P. C. Sperm function in workers exposed to N, N-dimethylformamide in the synthetic leather industry. **Fertil. Steril.**, v. 81, p. 1589-1594, 2004.

CHOE, C. Y.; KIM, J. G.; CHO, S. R.; SON, D. S.; KIM, Y. K.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Influence of Seasons, Extenders, Slow and Rapid Freezing on Seminal Characters in Korean Native Bucks. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 41, p. 55–60, 2006.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, p. 860-867, 2006.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. **Theriogenology**, v. 49, p. 831–41, 1997.

DAVIS, R. O.; KATZ, D. F. Standardization and comparability of CASA instruments. **J. Androl.**, v. 13, p. 81–6, 1992.

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

DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M.; SANZ, J. Computer-assisted analysis of goat sperm motility and velocity before and after cryopreservation. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 40, p. 401-2, 2005.

DORADO, J.; HIDALGO, M.; MUÑOZ, A.; RODRÍGUEZ, I. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 112, p. 150-157, 2009.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D. F.; RODRIGUES, M. T.; OLIVEIRA, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Anim. Reprod.**, v. 2, p. 139-144, 2005.

GILMORE, J. A.; MCGANN, L. E.; LIU, J.; GAO, D. Y.; PETER, A. T.; KLEINHANS, F. W.; CRITSER, J. K. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 53, p. 985-95, 1995.

GONZALEZ, R. A. R. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino.** 2004. 90f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade de São Paulo, Pirassununga.

HAMMERSTED, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.**, v. 11, p. 73-88, 1990.

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Effects of cooling, freezing and glycerol addition on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 51, p. 99-108, 1997.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 3-22, 2000.

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J. P. Evaluation of the "Hamilton Thorn Computer-Based Automated System" for dog semen analysis. **Theriogenology**, v. 55, p. 733-49, 2001.

JEULIN, C., FENEUX, D., SERRES, C., JOUANNET, P., GUILLET-ROSSO, F., BELLAISH-ALART, J., FRYDMAN, R., TESTART, J. Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization. **J. Reprod. Fertil.**, v. 76, p. 735–44, 1986.

KATZ, D. F.; DROBNIS, E. Z.; OVERSTREET, J. W. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. **Gamete Res.** v. 23, p. 443–69, 1989.

KOZDROWSKI, R.; DUBIEL, A.; BIELAS, W.; DZIĘCIOŁ, M. Two Protocols of Cryopreservation of Goat Semen with the Use of Computer-Assisted Semen Analysis System. **Acta Vet. Brno.**, v. 76, p. 601-604, 2007.

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

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

LOPES, K. R. F.; COSTA, L. L. M.; LIMA, G. L.; SOUZA, A. L. P.; SILVA, A. R. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v. 72, p. 650-654, 2009.

LUKASZEWICZ, E. An effective method for freezing White Italian gander semen. **Theriogenology**, v. 8, p. 19-27, 2002.

McLEOD, J.; GOLD, R. Z. The male factor in fertility and infertility – III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1,000 fertile men and 1,000 infertile marriages. **Fertil. Steril.**, v. 2, p. 187-202, 1951.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; HERREZ, P.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. **Biol. Reprod.**, v. 72, p. 316–27, 2005.

MAXWELL, W. M. C.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen. **Reprod. Fert. Dev.**, v. 5, p. 613-638, 1993.

MEDEIROS, A. S. L. **Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões.** 2003. 96f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu.

NJENGA, M. J.; MUNYUA, S. J. M.; MUTIGA, E. R.; GATHUMA, J. M.; KANG'ETHE, E. K.; BWANGAMOI, O.; MUGERA, G. M.; MITARU, B. N. Semen characteristics of goats with subacute, acute and chronic besnoitiosis: research communication. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 70, p. 18-20, 1999.

OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T.; KAMIJO, S. I.; KASHIWAZAKI, N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. **Exp. Anim.**, v. 56, p. 29–34, 2007.

OLIVEIRA, J. V.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; MACEDO, L. M.; DELL'AQUA Jr., J. A.; PAPA, F. O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. **Anim. Rep. Sci.**, v. 94. p. 82-84, 2006.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 859–75, 2000.

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

RITAR, A. J.; BALL, P. D.; O'MAY, P. J. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 2, p. 377–384, 1990a.

RITAR, A. J.; BALL, P. D.; O'MAY, P. J. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 2, p. 27–34, 1990b.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? **Reprod. Domest. Anim.**, v. 41, p. 2-10, 2006.

SAACKE, R. G.; WHITE, J. M. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: Proceedings of the Fourth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, National Association of Animal Breeders, Columbia, MO, USA, pp. 22-27.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 71-111, 2000.

SHANIS, B. F.; CHEK, J. H.; BOLLENDORF, A. Interpretation and misinterpretation of semen parameters. **Arch. Androl.**, v. 23, p. 213-7, 1989.

SILVESTRE, M. A., SALVADOR, I., SÁNCHEZ J. P., GÓMEZ, E. A. Effect of changing female stimulus on intensive semen collection in young Murciano-Granadina male goats. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 1641-1645, 2004.

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.

SIQUEIRA, A. P.; SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H.; PALHARES, M. S.; BORGES, A. M.; BRUSCHI, M. C. M.; PEIXOTO, M. P.; ROSSI, R. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, p. 66-71, 2009.

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

SUAREZ, S. S.; PACEY, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Hum. Reprod. Update**, v. 12, p. 23-37, 2006.

SUNDARARAMAN, M. N.; EDWIN, M. J. Semen production traits and freezability of spermatozoa of boer grade goats. **Indian. J. Anim. Reprod.**, v. 24, p. 109-112, 2003.

SUNDARARAMAN, M. N.; EDWIN, M. J. Changes in motility characteristics of goat spermatozoa during glycerol-equilibration and the relevance to cryopreservation. **Asian J. Cell. Biol.**, v. 3, p. 22-23, 2008.

THURSTON, L. M.; WATSON, P. F.; MILEHAM, A. J.; HOLT, W. V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **J. Androl.**, v. 22, p. 382-94, 2001.

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

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149–79, 2002.

VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F. X.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Anim. Rep. Sci.**, v. 112, p. 22-35, 2009.

VOSS, J. L.; PICKET, B. W.; SQUIRES, E.L. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 178, p. 287–9, 1981.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 871–91, 1995.

**ANEXOS**

ANEXO 01 - CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “ASSESSMENT OF THE INTERACTION BETWEEN STRAW SIZE AND THAWING RATE AND ITS IMPACT ON IN VITRO QUALITY OF POST-THAW GOAT SEMEN” À REVISTA *THERIOGENOLOGY*

Submission Confirmation

De:  [ees.therio.0.4fe1d.05b76c44@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.therio.0.4fe1d.05b76c44@eesmail.elsevier.com) em nome de **Theriogenology** (esubmission@elsevier.com)  
 Você pode não conhecer este remetente. [Marcar como confiável](#) | [Marcar como lixo](#)  
Enviada: quinta-feira, 12 de novembro de 2009 21:52:24  
Para: [silvestrebrilhante@hotmail.com](mailto:silvestrebrilhante@hotmail.com)

Dear Mr. Bezerra,

Your submission entitled "Assessment of the interaction between straw size and thawing rate and its impact on in vitro quality of post-thaw goat semen" has been received by Theriogenology.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,  
Elsevier Editorial System,  
Theriogenology

ANEXO 02 - ASSESSMENT OF THE INTERACTION BETWEEN STRAW SIZE AND THAWING RATE AND ITS IMPACT ON IN VITRO QUALITY OF POST-THAW GOAT SEMEN

Original do trabalho: Avaliação da interação entre a capacidade da palheta e a taxa de descongelamento e seu impacto sobre a qualidade do sêmen caprino descongelado *in vitro*.  
Submetido para publicação na *Theriogenology*.

**Assessment of the interaction between straw size and thawing rate and its impact on in vitro quality of post-thaw goat semen<sup>1</sup>**

**F. S. B. Bezerra, T. S. Castelo, E. A. A. Santos, T. C. Dantas, G. C. X. Peixoto, B. R. Simão, A. R. Silva\***

Laboratory of Animal Germplasm Conservation, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, BR 110, Km 47, Costa e Silva, 59625-900, Mossoró, RN, Brazil

**Abstract**

The existence of interactions among different straw sizes and thawing rates on the post-thaw goat semen parameters was studied. Twenty-one ejaculates (seven per animal) were collected from three stud bucks by using an artificial vagina and immediately evaluated for gross and microscopic semen characteristics. The semen was extended in Tris-egg yolk-glycerol and packed in 0.25- and 0.50-mL straws, followed by storage in liquid nitrogen.

Thawing was performed using two different rates: 37°C/1 min and 55°C/7 s. No effects of the interactions between straw size and thawing rate were verified on the semen parameters ( $P > 0.05$ ). When analyzed separately, the thawing rates produced the same reduction in sperm parameters ( $P > 0.05$ ), however, the 0.50-mL straw produced a better conservation than the 0.25-mL one for kinematic parameters, after the frozen thawing procedures ( $P < 0.05$ ). In conclusion, goat semen should be packed in 0.50-mL straw, and thawed at any of the thawing rates used in the present study.

*Keywords:* Cryopreservation; Goat; Semen; Straw size; Thawing rate

## **1. Introduction**

Cryopreservation as a technique for storage of goat semen allows us to support a genome resource bank for an indefinite period of time. Nevertheless, freezing and thawing induces detrimental effects in terms of the sperms' ultra structural, biochemical, and functional damage [1], resulting in a reduction of motility, membrane integrity, and fertilizing ability [2]. Many factors such as freezing rate [3], extender [4], cryoprotectant [5], dilution rate [6, 7], and packaging method [8, 9] affect the quality of frozen-thawed semen from different species. However, for goats, packaging in 0.25- and 0.5-mL French straws does not seem to affect sperm motility [10].

Thawing rate is another important factor that affects semen parameters [11]. Traditionally, straws containing goat semen are thawed by placing it in a 37°C water bath for 12–30 s [1, 12], but another slow protocol (5°C/2 min in water bath) can be used with lesser efficiency [13]. Tuly et al. [11] observed a significantly higher progressive motility on goat semen thawed at 70°C/7 s, compared to the thawing rates of 37°C/2 min or 40°C/20 s.

Many studies have conducted to assess the influence of different packaging methods on sperm survival, using different thawing procedures for boar [14], fishes [15], ram [9], and dog [16]. In spite of these studies, there is a lack of information with regard to the interactions between packaging methods and thawing rates for goat semen. The aim of this study is to assess the interactions among straws of different sizes and different thawing rates and their impact on the post-thaw goat semen parameters.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Experimental animals*

Semen was collected from three stud bucks, one Savannah and two Boers. They were healthy and sexually mature, with an age of approximately two years. Experimental protocols and animal care were approved by the research committee of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Brazil. They were raised on a farm located in the rural area of Mossoró (5°11'S, 37°W, and an altitude of 16 m), northeast Brazil. The goats were maintained with extensive management with free access to the native vegetation, without restrictions of feed and water, but two days before the semen collection they were housed in a common covered shelter, separated from females. The experiment was conducted from May to July 2009.

### *2.2. Semen collection*

One month before starting the experiments, all the bucks were trained for semen collection in an artificial vagina (43°C) connected to a glass graduated tube using an induced-estrus doe as a teaser [17]. Semen was collect from each buck twice a week. Immediately

after collection, the ejaculates were maintained immersed in a warm water bath at 37°C until their assessment. Semen assessment was performed within approximately 15 min, and only those semen samples with at least 80% spermatozoa with individual progressive motility were selected for freezing. A total of 21 ejaculates (seven per animal) were used in this experiment.

### *2.3. Semen evaluation*

Color, aspect, and volume were evaluated in the fresh semen. Microscopic criteria such as sperm progressive motility (%) and mass activity (0–5 scale) were performed subjectively by light microscopy (Nikon, Eclipse E200, Tokyo, Japan) under 100x magnification. Percentage of live spermatozoa was established by analyzing a slide stained with Brome-phenol Blue under light microscopy (400×), counting 200 cells per slide. Following the initial assessment, a 10 µl semen aliquot was diluted in 2 mL of buffered formalin (10%), and the sperm concentration (sperm  $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) was determined using a Neubauer counting chamber. For sperm morphology evaluation, 200 sperm cells from random fields in Bengal Rose smears were analyzed by light microscopy, under 1000x magnification. The total sperm defects were counted in 200 cells, following their classification as primary or secondary [18]. The acrosomal integrity was also evaluated. For the evaluation of sperm membrane integrity, a hypo-osmotic swelling test (HOST) was performed immediately after the collection of semen, using a sodium citrate and fructose hypo-osmotic solution (100 mOsm/l). A total of 200 spermatozoa were counted using a phase-contrast microscope at 400x magnification, and spermatozoa presenting with swollen coiled tails were considered as presenting a functional sperm membrane [19].

### *2.4. Semen processing and storage*

An extender consisting of 3.028 g Tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1.78 g monohydrated citric acid, and 1.25 g D-fructose, dissolved in 100 mL of distilled water, was used [20]. The osmosis of this solution was 295 mOsm/l and the pH 6.6. Two-and-a-half percent of this solution was subsequently replaced by egg-yolk.

The semen was initially extended in Tris-egg yolk at room temperature (32°C). Samples were kept in an isothermal box and transported to the laboratory. After 40 min, the temperature in the isothermal box reached 15°C (-0.30°C/min), and the samples were transferred to a refrigerator for a further 30 min, where it reached 4°C at 0.37°C/min. After cooling, the semen was added to Tris-egg yolk plus glycerol in a final concentration of 6%. The final dilution resulted in a sperm concentration of  $150 \times 10^6$  sperm/mL. Each sample was packed into previously marked 0.5- (n = 4) and 0.25-mL (n = 4) plastic straws, which were placed horizontally in a thermal box for 5 min, 5 cm above the liquid nitrogen (N<sub>2</sub>) level, reaching a temperature closer to -70°C in the vapor. Finally, the straws were plunged into liquid N<sub>2</sub> for storage up to the thawing day [21].

### *2.5. Thawing techniques*

The straws were removed from the liquid nitrogen and randomly thawed seven days after freezing. Both 0.5- and 0.25-mL straws of each sample were thawed on a water bath, at 37°C/1 min, and other ones from the same sample on a water bath at 55°C/7 s, following a further 30 s at 37°C. Finally, the straws were removed and dried, the plug cut off, and the contents pushed out into a glass vial that stood in a water bath at 37°C. The semen samples were immediately evaluated for sperm progressive motility, live sperms, morphology, and acrosomal and membrane integrity.

### *2.6. Statistical analyses*

Twenty-one replicates were performed for each treatment. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM. The data were checked for normality using the Shapiro-Wilk test, and for homoscedasticity via the Levene's test using the univariate procedure of the Statistical Analysis System (SAS 6.10, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). To evaluate the effect of different factors and their interactions on the variables considered in the study, the data were subjected to the analysis of variance using the General Linear Model procedure (GLM). Comparison among the different treatments of the semen parameters were analyzed using the Tukey test. For all statistical analysis, significance was established at  $P < 0.05$ .

## **3. Results**

### *3.1. Fresh and extended semen*

Fresh goat semen was yellowish in color and milky in aspect. The total volume of ejaculates was  $1.1 \pm 0.4$  mL, with a sperm concentration of  $2.4 \pm 1.0 \times 10^9$  spermatozoa/mL. Sperm progressive motility of fresh semen was  $94.9 \pm 1.7\%$ , and mass activity was  $3.9 \pm 0.1$ . Percentage of live sperm was  $92.7 \pm 2.0\%$  and sperm with normal morphology was  $76.2 \pm 1.8\%$ , in which  $99.8 \pm 0.1\%$  spermatozoa were with intact acrosome and  $30.8 \pm 2.0\%$  with functional membrane integrity. Total defects were found in  $23.9 \pm 1.7\%$ , wherein,  $1.0 \pm 1.2\%$  were classified as primary and  $22.9 \pm 1.7\%$  as secondary. Extended semen presented  $93.8 \pm 1.7\%$  of progressive motility, while after the cooling process and addition of glycerol there was a significant reduction to  $70.5 \pm 1.7\%$  ( $P > 0.05$ ).

### *3.2. Post-thaw sperm characteristics*

Data for post-thaw sperm characteristics are shown in Table 1. The cryopreservation process greatly affected sperm progressive motility and the percentage of live spermatozoa ( $P < 0.05$ ). No differences among fresh semen and treatments (straw size and thawing rate) were verified for acrosomal integrity ( $P > 0.05$ ). However, a significant increase in the total and secondary defects was identified for all the treatments, compared to fresh semen. Also, a decrease in the membrane integrity of the semen packed into 0.25-mL straws was found ( $P < 0.05$ ). No interactions between straw sizes and thawing rates after thawing were verified ( $P > 0.05$ ).

### *3.3. Isolated effects of semen packaging and thawing techniques*

When the data were grouped according to the thawing rate, no differences were verified between 37°C/1 min and at 55°C/7 s for all assessed parameters ( $P > 0.05$ ). Otherwise, when the effect of straw size was compared alone, sperm progressive motility was significantly better preserved with the use of 0.5-mL straws (Table 2).

## **4. Discussion**

A decrease in sperm progressive motility has been verified from semen extension to glycerol addition. It is clear that chilling lowers the motility of the sperm, whereas, glycerol induces osmotic and structural damages in the sperm, which result in reduction of goat semen kinematic parameters [21]. The low values found for membrane integrity in fresh semen suggest that the HOST is not the best option for the evaluation of this parameter in goat semen. Fonseca et al. [19] tested ten hypo-osmotic solutions varying from 50 and 300 mOsm/l, to use in this test, for goat fresh semen, and also found values lower than 50% for

membrane integrity. Further studies should be conducted in order to develop an efficient method to assess membrane integrity in this species and the use of fluorescent stains appears to be a good alternative [22].

Furthermore, the evaluation of live sperms after thawing was impaired once as the cryopreservation process caused changes in the membrane integrity, and the Bromophenol Blue staining technique was based on the permeability of the membrane. Cryopreservation caused phase transitions of the lipids in the membrane of spermatozoa [23]. This vulnerability was due to lipids and proteins in the membrane that were not covalently linked and could move easily [24].

It is found that different lipids have different phase transition temperatures, with some types of lipid aggregates in domains of gel-like (frozen) lipids, thus excluding other lipid types that remain in the liquid-crystalline (melted) state [23, 25]. Membrane proteins are also excluded from these gel domains and consequently find themselves in a non-physiological lipid environment [25]. This is believed to impair the function of membrane proteins that are necessary for structural integrity or ion metabolism [1].

In spite of a group of factors together affecting the post-thaw goat semen quality, the interaction between thawing procedures and straw packaging methods has not been verified. These results disagree with that found for dogs, in which an interaction between 0.5-mL straw with a thawing rate of 70°C/5 s promotes the best post-thaw semen quality [16]. According to Lahnsteiner [26], the thawing rate is the most sensitive parameter during semen cryopreservation, and must be carried out at high temperatures, to avoid recrystallization. The warming damage occurs when the spermatozoa pass through the critical zone of -50 to -15°C or up to -5°C. Similarly, spermatozoa suffer osmotic stress, when the duration of thawing is

insufficient for the outflow of excess cryoprotectants from the cell and the spermatozoa swell and lyse as the medium dilutes abruptly on account of melting of the extracellular ice [27].

The thawing rates used in the present study do not seem to be different in promoting spermatozoa damages, probably because 37°C/1 min and 55°C/7 s for goat semen do not produce sufficient differences in the amount of large ice crystals formed during recrystallization, which are very deleterious for spermatid cells. In fact, for goat semen, different temperatures have been used in protocols of thawing by different authors [11, 13, 21, 28]. Neither the thawing procedure at 37°C/1 min nor at 55°C/7 s has produced a better quality in post-thaw semen ( $P > 0.05$ ). On the other hand, studies have demonstrated that a fast thawing rate results in better post-thaw quality when compared with slower thawing, in the case of stallions, rams [29], bulls [30], boars [14], and dogs [16]. However, there is a plateau in the relation between thawing rate and sperm survival; nevertheless, by increasing the temperature from 50 to 70°C, sperm motility could not be further improved [31]. We hypothesize that a plateau from 37°C to 55°C would also not affect the semen quality of the caprine species.

The surface-to-volume ratio of the package has important implications for the cooling, freezing, and thawing rates of semen. Semen packaging is also important for practical reasons, as it determines both the means of identification of each dose of semen and how it may be arranged for storage in the liquid nitrogen container [8]. In the current study we have clearly demonstrated a significant difference ( $P < 0.05$ ) between progressive motility found for goat semen frozen in 0.50- and 0.25-mL straws. The pattern of cooling and initiation of ice crystallization depend, among other factors, on the size of the straws. The 0.25-mL straw has a higher surface-to-volume ratio than the 0.50-mL one, which increases the opportunity for post-thaw temperature changes of the semen within the straw. Such changes can compromise

the post-thaw recovery of live spermatozoa and thus decrease fertility [32]. Our results disagree with a previous study [10], which has concluded that a difference does not exist between goat sperm frozen in 0.25- (33% post-thaw motility) and 0.50-mL straws (34% post-thaw motility). In addition, bull semen packaged in 0.25- and 0.50-mL straws, thaws at 37°C/30 s in both cases, provided they have similar conception percentages [32].

In spite of our results, the difference found for progressive motility after thawing between 0.25 and 0.5-mL straws was low, and we hypothesize few biological implications on total fertility. On other hand, when compared the total number of spermatozoa in the 0.50mL straws we observe twice more spermatozoa then that included in a 0.25mL straw, what could increase the fertility rate if used on in vivo tests. These observations confirm that goat semen should be packed in 0.50mL straws to achieve higher results of fertility after thawing procedure.

In conclusion, we can determine that it does not matter if goat semen in 0.25- or 0.50-mL straw is thawed at a thawing rate of 37°C/1 min or 55°C/7 s, but the packaging should be made in 0.50-mL straws to achieve higher results of post-thawing kinematic parameters.

### **Acknowledgments**

We are grateful to people from Frei Damião Farm for their inestimable help in the fieldwork, and to Bank of Northeast, Brazil (BNB) for financial support.

### **References**

- [1] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;60–61:481–92.
- [2] Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res* 2006;63:215–225.

- [3] Chemineau P, Cagnie Y, Guerin Y, Orgeur P, Vallet JC. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 1991. Pp. 115-161.
- [4] Hashemi A, Farhoomand P, Pirmohammadi R, Nayebpor M, Razzaghzadeh S. Effect of extender and thawing methods on post thawing preservation. *J Anim Vet Adv* 2007;6:1337-1339.
- [5] Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva AR. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 2009;72:650-644.
- [6] Evans G, Maxwell WMC. Frozen storage of semen. In: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butter-worths, Wellington, New Zealand. 1987. pp. 122-154.
- [7] Ritar AJ, Ball PD, O'May PJ. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reprod Fertil Dev* 1990;2:377-384.
- [8] Maxwell WMC, Landers AJ, Evans G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology* 1995;43:1202-1210.
- [9] Paulenz H, Söderquist L, Ådnøy T, Nordstoga A, Gulbrandsen B, Berg KA. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology* 2004;61:1719-1727.
- [10] Ritar AJ, Ball PD, O'May PJ. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod Fertil Dev* 1990;2:27-34.
- [11] Tuli RK, Schmidt-Baulain R, Holtz W. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Anim Reprod Sci* 1991;25:125-131.

- [12] Cabrera F, González F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season of sperm freezability of canary Buck (*Capra hircus*). *Reprod Dom Anim* 2005;40:191-195.
- [13] Deka BB, Rao AR. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. *Ind Vet J* 1987;64:591-594.
- [14] Eriksson BM, Rodriguez-Martinez H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Anim Reprod Sci* 2000;63:205-220.
- [15] Richardson GF, Miller TI, McNiven MA. Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. *Aquacult Res* 2000;31:307-315.
- [16] Nöthling JO, Shuttleworth R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology* 2005;63:1469-1480.
- [17] Silvestre MA, Salvador I, Sánchez JP, Gómez EA. Effect of changing female stimulus on intensive semen collection in young Murciano-Granadina male goats. *J Anim Sci* 2004;82:1641-1645.
- [18] Njenga MJ, Munyua SJM, Mutiga ER, Gathuma JM, Kang'ethe EK, Bwangamoi O, Mugeru GM, Mitaru BN. Semen characteristics of goats with subacute, acute and chronic besnoitiosis : research communication. *J S Afr Vet Assoc* 1999;70:18-20.
- [19] Fonseca JF, Torres CAA, Maffili VV, Borges AM, Santos ADF, Rodrigues MT, Oliveira RFM. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim Reprod* 2005;2:139-144.
- [20] Siqueira AP, Silva Filho JM, Fonseca JF, Bruschi JH, Palhares MS, Borges AM, Bruschi MCM, Peixoto MP, Rossi R. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino

resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. [Conception rate of goats inseminated with sêmen cooled in egg yolk diluent at 5°C, for 12 or 24 hours]. Arq Bras Med Vet Zootec 2009;61:66-71.

[21] Sundararaman MN, Edwin MJ. Changes in motility characteristics of goat spermatozoa during glycerol-equilibration and the relevance to cryopreservation. Asian J Cell Biol 2008;3:22-23.

[22] Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM, Chirinéa VH, Lopes MD, Souza FF. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters os in vitro sperm-oocyte interactions. Theriogenology 2006;66:456-462.

[23] Woelders H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. Vet Quart 1997;19:135-138.

[24] Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology 1992;38:209-222.

[25] Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology 2002;38:327-44.

[26] Lahnsteiner F. Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. Aquacult Res 2000;31:245-258.

[27] Andrabi SMH. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. Int J Agr Biol 2007;9:367-369.

[28] Khalifa TAA, El-Saidy BE. Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. Am-Euras J Agric & Environ Sci 2006;1:288-293.

[29] Watson PF. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Marshall's Physiology of Reproduction, Lamming G (Ed.), Edinburgh, London: Churchill Livingstone, 1990, pp. 747-869.

[30] Pace MM, Sulliva JJ, Elliott FI, Graham EF, Coulter GH. Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in .5mL French straws. *J Anim Sci* 1981;53:693-701.

[31] Woelders H., Malva AP. How important is the cooling rate in cryopreservation of (bull) semen, and what is its relation to thawing rate and glycerol concentration. *Reprod Dom Anim* 1998;33:299-305.

[32] Johnson MS, Senger PL, Allen CH, Hancock DD, Alexander BM, Sasser RG. Fertility of bull semen packaged in .25 and .5-milliliter French straws. *J Anim Sci* 1995;73:1914-1919.

Table 1

Mean values ( $\pm$  S.E.M.) for characteristics of frozen goat semen packed into straws of 0.25- or 0.50-mL and thawed at 37°C/1 min or 55°C/7 s (n = 21).

Sperm parameter	Fresh semen	0.25 mL			0.50 mL		
		37°C/1 min	55°C/7 s	37°C/1 min	55°C/7 s	37°C/1 min	55°C/7 s
Progressive motility (%)	94.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	32.2 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	30.4 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	36.3 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	37.2 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	37.2 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	37.2 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
Live sperm (%)	92.7 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	16.2 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	17.2 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	15.2 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	15.6 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	15.6 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	15.6 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>
Membrane integrity (%)	30.8 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	22.8 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	21.6 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	23.4 $\pm$ 1.9 <sup>ab</sup>	24.1 $\pm$ 2.0 <sup>ab</sup>	24.1 $\pm$ 2.0 <sup>ab</sup>	24.1 $\pm$ 2.0 <sup>ab</sup>
Normal sperm (%)	76.2 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	62.4 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	65.4 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	60.9 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	63.4 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	63.4 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	63.4 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
Total defects (%)	23.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	37.6 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	34.6 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	39.1 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	36.6 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	36.6 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	36.6 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
Primary defects (%)	1.0 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
Secondary defects (%)	22.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	36.4 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	33.5 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	37.7 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	35.4 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	35.4 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	35.4 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
Acrosomal integrity (%)	99.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	99.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	99.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	99.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	99.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	99.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	99.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Within a row, values with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Table 2

Mean values ( $\pm$  S.E.M.) for frozen-thawed goat sperm characteristics comparing the effect of thawing rate and straw size separately (n = 21).

Sperm parameter	Thawing rate*			Straw size	
	37°C/1min	55°C/7s	0.25MI	0.25MI	0.50mL
Progressive motility (%)	34.3 $\pm$ 1.4	34.1 $\pm$ 1.5	31.4 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	36.9 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	
Live sperm (%)	16.0 $\pm$ 1.4	17.0 $\pm$ 1.5	17.1 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	15.9 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	
Membrane integrity (%)	23.2 $\pm$ 1.3	22.7 $\pm$ 1.3	22.4 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	23.5 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	
Normal sperm (%)	61.6 $\pm$ 0.1	64.2 $\pm$ 1.0	63.7 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	62.1 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	
Total defect (%)	38.4 $\pm$ 0.1	35.8 $\pm$ 1.0	36.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	37.9 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	
Primary defects (%)	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	
Secondary defects (%)	37.2 $\pm$ 1.0	34.6 $\pm$ 1.0	35.1 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	36.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	
Acrosomal integrity (%)	99.6 $\pm$ 0.1	99.4 $\pm$ 0.1	99.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	99.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	

\* No significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed between thawing rates.

<sup>a,b</sup> Within a row, values with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

## ANEXO 03 – DESCRIÇÃO DOS MODELOS ESTATÍSTICOS UTILIZADOS

**A) Modelo estatístico utilizado no experimento do Capítulo 3**

Avaliou-se, inicialmente, a condição de normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk, para todas as variáveis em estudo, utilizando-se o procedimento *univariate* do SAS (*Statistical Analysis System*, versão 6.10). Para realização da análise estatística, utilizaram-se dois modelos de matemáticos, sendo o primeiro modelo utilizado para avaliar o efeito do processo de congelamento do sêmen sobre as variáveis motilidade progressiva, % de vivos, % de espermatozóides com membrana funcional, % de alterações morfológicas e % de alterações primárias e secundárias, empregando-se o modelo descrito a seguir:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + C_j + I_{(ixj)} + A_k(T_i) + A_k(C_j) + \varepsilon_{ijkl}$$

Onde:  $Y_{ijkl}$  = Valor observado das variáveis no  $i$ -ésimo tratamento, na  $j$ -ésima coleta e no  $k$ -ésimo animal;  $\mu$  = Média Geral;  $T_i$  = Efeito do  $i$ -ésimo tratamento ( $i=1; 2; 3$ );  $C_j$  = efeito da  $j$ -ésima coleta ( $j=1, 2, \dots, 7$ );  $I_{(ixj)}$  = efeito da interação entre o  $i$ -ésimo tratamento e a  $j$ -ésima coleta;  $A_k(T_i)$  = Efeito do  $k$ -ésimo animal ( $k=1; 2; 3$ ) dentro do  $i$ -ésimo tratamento;  $A_k(C_j)$  = Efeito do  $k$ -ésimo animal dentro da  $j$ -ésima coleta e  $\varepsilon_{ijkl}$  = Erro aleatório associado a cada observação.

Para estudar o efeito da descongelação do sêmen, admitiu-se um segundo modelo que avaliou o efeito dos fatores capacidade da palheta e taxa de descongelação, sendo apresentado o modelo matemático utilizado descrito abaixo:

$$Y_{ijklm} = \mu + P_i + T_j + I_{(ixj)} + C_k + C_k(I_{(ixj)}) + A_l(I_{(ixj)}) + A_l(C_k) + \varepsilon_{ijklm}$$

Onde:  $Y_{ijklm}$  = Valor observado das variáveis na  $i$ -ésima capacidade da palheta, na  $j$ -ésima taxa de descongelação, na  $k$ -ésima coleta e no  $l$ -ésimo animal;  $\mu$  = Média Geral;  $T_i$  = Efeito específico da  $i$ -ésima capacidade da palheta ( $i=1; 2$ );  $T_j$  = efeito da  $j$ -ésima taxa de descongelação ( $j=1, 2$ );  $I_{(ixj)}$  = efeito da interação entre a  $i$ -ésima capacidade da palheta e a  $j$ -ésima taxa de descongelação;  $C_k$  = efeito da  $k$ -ésima coleta ( $k=1; 2; \dots; 7$ );

$C_k(I_{(ixj)})$  = Efeito da l-ésima coleta dentro da interação  $I_{(ixj)}$ ;  $A_l(I_{(ixj)})$  = Efeito do l-ésimo animal ( $l=1; 2; 3$ ) dentro da interação  $I_{(ixj)}$ ;  $A_l(C_k)$  = Efeito do l-ésimo animal dentro da k-ésima coleta e  $\varepsilon_{ijkl}$  = Erro aleatório associado a cada observação.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) por meio do procedimento “PROC GLM” do SAS (*Statistical Analysis System*, versão 6.10) e quando foi observada diferença significativa entre os tratamentos pelo teste “F” ( $P<0,05$ ), realizou-se o teste de tukey para comparação entre as médias.

## B) Modelo estatístico utilizado no experimento do Capítulo 4

Avaliou-se, inicialmente, a condição de normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk, para todas as variáveis em estudo, utilizando-se o procedimento univariate do SAS (*Statistical Analysis System*, versão 6.10). Os dados sofreram a transformação ( $\sqrt{X + 100}$ ), para estabilizar a variância. Para realização da análise estatística, utilizou-se um modelo matemático descrito a seguir:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + C_j + A_k + I_{(ij)} + I_{(ik)} + I_{(jk)} + \varepsilon_{ijkl}$$

Onde:  $Y_{ijkl}$  = Valor observado das variáveis no i-ésimo tratamento, na j-ésima coleta e no k-ésimo animal;  $\mu$  = Média Geral;  $T_i$  = Efeito do i-ésimo tratamento ( $i=1; 2$ );  $C_j$  = efeito da j-ésima coleta ( $j=1, 2, \dots, 7$ );  $I_{(ij)}$  = efeito da interação entre o i-ésimo tratamento e a j-ésima coleta;  $A_k$  = Efeito do k-ésimo animal ( $k=1; 2; 3$ );  $I_{ij}$  = Efeito da interação entre o i-ésimo tratamento e a j-ésima coleta;  $I_{ik}$  = Efeito da interação entre o i-ésimo tratamento e o k-ésimo animal;  $I_{jk}$  = Efeito da interação entre a j-ésima coleta e o k-ésimo animal e  $\varepsilon_{ijkl}$  = Erro aleatório associado a cada observação.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) por meio do procedimento “PROC GLM” do SAS (*Statistical Analysis System*, versão 6.10) e quando foi observada diferença significativa entre os tratamentos pelo teste “F” ( $P<0,05$ ), realizou-se o teste de tukey para comparação entre as médias das diferentes variáveis.

Como os dados para a variável fertilidade eram respostas sim/não e a frequência esperada foi menor que cinco, os dados foram submetidos ao Teste Exato de Fisher, considerando o nível de 5% de significância, a fim de observar a relação significativa

entre os tratamentos estudados. Para avaliar o efeito individual dos animais e suas interações com os efeitos dos crioprotetores sobre as variáveis estudadas, os dados foram avaliados pelo teste de Fisher PSLD, também considerando o nível de 5% de significância.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)