

HERBERT ROVAY

**EFEITO DE DIFERENTES CURVAS DE RESFRIAMENTO,  
TEMPOS DE EQUILÍBRIO E CRIOPROTETORES  
PERMEÁVEIS NO CONGELAMENTO DE  
ESPERMATOZÓIDES DE CAPRINOS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006

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

T

R873e  
2006

Rovay, Herbert, 1980-

Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozóides de caprinos / Herbert Rovay. – Viçosa : UFV, 2006.

xv, 56f. : il. ; 29cm.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Caprino - Sêmen - Criopreservação. 2. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. 3. Sêmen - Congelamento. 4. Caprino - Reprodução. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

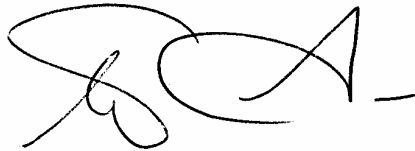
CDD 22.ed. 599.64713

HERBERT ROVAY

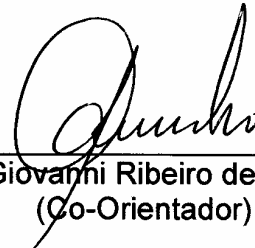
**EFEITO DE DIFERENTES CURVAS DE RESFRIAMENTO,  
TEMPOS DE EQUILÍBRIO E CRIOPROTETORES  
PERMEÁVEIS NO CONGELAMENTO DE  
ESPERMATOZÓIDES DE CAPRINOS**

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

APROVADA: 14 de agosto de 2006.



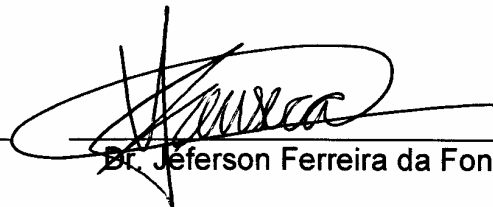
Prof. Eduardo Paulino da Costa  
(Co-Orientador)



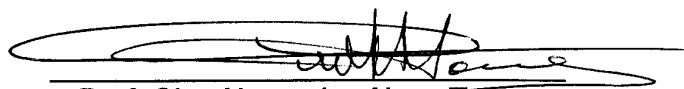
Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho  
(Co-Orientador)



Prof. José Domingues Guimarães



Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca



Prof. Ciro Alexandre Alves Torres  
(Orientador)

Muitos dos fracassos desta vida estão concentrados nas pessoas que desistiram, por não saberem que estavam muito perto da linha de chegada...

Thomas Edson

A meus pais e meus irmãos eu agradeço por tudo, principalmente por terem me dado tudo aquilo que muitas vezes lhes faltou.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, pois sem Ele todos caminhos pelos quais percorri haveriam de ser ainda mais tortuosos, e principalmente pela família (pais, irmãos e amigos) que o Senhor tornou possível estar ao meu lado durante toda minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, por ter fornecido as condições para a realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realizar o Programa de Pós-Graduação.

Ao professor orientador, Ciro Alexandre Alves Torres, pela amizade, experiência, compreensão, confiança e, principalmente, paciência.

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

Ao amigo Rogério Fürst, pelo exemplo de profissional e pelo precioso e indispensável apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Miller Palhão, Charles Bispo, Reno Roldi e Luiz Gustavo, por terem tornado meus caminhos muito mais divertidos e agradáveis. Eterno seja nosso brinde!

À estagiária Aline Paixão, sempre pense bastante antes de responder algo...

Por fim, eu agradeço a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

HERBERT ROVAY, filho de Cláudio José Rovay e Neide do Nascimento Rovay, nasceu no dia 5 de junho de 1980, na cidade de Santos-SP.

Em março de 1998, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em março de 2005, após participar por um ano e meio do programa de *Trainee* em agricultura, oferecido pela University of Minnesota, nos Estados Unidos.

Em março de 2005, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível Mestrado, na área de concentração em Reprodução Animal, pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Inseminação artificial em caprinos .....	3
2.2. Criobiologia .....	4
2.2.1 Biologia espermática.....	4
2.2.2 Membrana plasmática .....	5
2.2.3 Efeito do resfriamento sobre a membrana plasmática.....	6
2.3. Taxas de resfriamento e tempos de equilíbrio utilizados na criopreservação do sêmen caprino .....	6
2.4. Diluentes utilizados na criopreservação do sêmen caprino .....	7
2.5. Crioprotetores permeáveis utilizados na criopreservação do sêmen caprino .....	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	10
EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE RESFRIAMENTO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINOS .....	14
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	15



	<b>Página</b>
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3. RESULTADOS .....	20
4. DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÕES .....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE EQUÍLIBRIO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO .....	31
RESUMO .....	31
ABSTRACT .....	32
1. INTRODUÇÃO .....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3. RESULTADOS .....	36
4. DISCUSSÃO.....	39
5. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
EFEITO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES PERMEÁVEIS SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO.....	43
RESUMO .....	43
ABSTRACT .....	44
1. INTRODUÇÃO .....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	46
3. RESULTADOS .....	48
4. DISCUSSÃO.....	51
5. CONCLUSÃO.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>1º Artigo</b>	
1 Características seminais de bodes das raças Pardo Alpino e Saanen, doadores de sêmen para experimentação em criopreservação espermática .....	21
2 Valores médios e desvios-padrão de defeitos de acrossoma e defeitos espermáticos totais do sêmen de bodes das raças Pardo Alpina e Saanen submetido à criopreservação, utilizando-se duas diferentes protocolos de resfriamento .....	23
<b>2º Artigo</b>	
1 Características seminais de bodes das raças Pardo Alpina e Saanen, doadores de sêmen para experimentação em criopreservação espermática .....	36
2 Valores médios e desvios-padrão de defeitos de acrossoma e defeitos espermáticos totais do sêmen de bodes das raças Pardo Alpina e Saanen submetido à criopreservação, utilizando-se o tempo de equilíbrio de 15 (TE 1) ou 75 minutos (TE 2) .....	39
<b>3º Artigo</b>	
1 Características seminais de bodes das raças Pardo Alpina e Saanen, doadores de sêmen para experimentação em criopreservação espermática .....	49

**3º Artigo**

2	Valores médios e desvios-padrão de defeitos de acrossoma e defeitos espermáticos totais do sêmen de bodes das raças Pardo Alpina e Saanen submetido à criopreservação, utilizando-se o glicerol e o etileno glicol (EG) como crioprotetores .....	51
---	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>1º Artigo</b>		
1	Curva de resfriamento 1 (PR1), taxa de resfriamento em função do tempo.....	18
2	Curva de resfriamento 2 (PR2), taxa de resfriamento em função do tempo (Fonte: adaptado de Furst, 2002).....	19
3	Valores médios (%) e desvios-padrão da motilidade espermática progressiva para o sêmen fresco (SF) e para o teste de termo-resistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação, e da taxa de recuperação de motilidade (TRMot), submetidos a diferentes protocolos de resfriamento .....	23
4	Valores médios e desvios-padrão do vigor espermático, durante o teste de termo-resistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação, submetido a diferentes métodos de resfriamento. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no vigor espermático entre os protocolos de resfriamento avaliados pelo teste F .....	22
5	Valores médios (%) e desvios-padrão do sêmen fresco (SF) e descongelado (SD) de espermatozóides vivos e com membrana plasmática da cauda funcional, avaliados pelo teste supravital e pelo teste hipoosmótico (HOST), respectivamente, submetidos aos diferentes protocolos de resfriamento .....	23

**2º Artigo**

- |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Valores médios (%) e desvios-padrão da motilidade espermática progressiva para o sêmen fresco (SF) e para o teste de termorresistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação, e da taxa de recuperação de motilidade (TRMot) do sêmen caprino criopreservado, utilizando-se o tempo de equilíbrio de 15 (TE 1) ou 75 minutos (TE 2) .....      | 37 |
| 2 | Valores médios e desvios-padrão do vigor espermático, durante o teste de termorresistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação, utilizando-se o tempo de equilíbrio de 15 (TE 1) ou 75 minutos (TE 2). Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no vigor espermático entre os protocolos de resfriamento avaliados pelo teste F .....              | 37 |
| 3 | Valores médios (%) e desvios-padrão do sêmen fresco (SF) e descongelado (SD) de espermatozóides vivos e com membrana plasmática da cauda funcional, avaliados pelo teste supravital e pelo teste hipoosmótico (HOST), respectivamente, do sêmen caprino criopreservado utilizando-se o tempo de equilíbrio de 15 (TE 1) ou 75 minutos (TE 2) ..... | 38 |

**3º Artigo**

- |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Valores médios (%) e desvios-padrão da motilidade espermática progressiva para o sêmen fresco (SF) e para o teste de termorresistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação, e da taxa de recuperação de motilidade (TRMot) do sêmen caprino criopreservado, utilizando-se o glicerol e o etileno glicol (EG) como crioprotetores .....                   | 49 |
| 2 | Valores médios e desvios-padrão do vigor espermático durante o teste de termorresistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação do sêmen caprino congelado, utilizando-se o glicerol e o etileno glicol (EG) como crioprotetores. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no vigor espermático entre os protocolos de resfriamento avaliados pelo teste F ..... | 50 |
| 3 | Valores médios (%) e desvios-padrão do sêmen fresco (SF) e descongelado (SD) de espermatozóides vivos e com membrana plasmática da cauda funcional, avaliados pelo teste supravital e pelo teste hipoosmótico (HOST), respectivamente, do sêmen caprino criopreservado utilizando-se o glicerol ou o etileno glicol (EG) como crioprotetores .....             | 51 |

## RESUMO

HOVAY, Herbert, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2006.  
**Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozóides de caprinos.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Orientadores: Eduardo Paulino da Costa e Giovanni Ribeiro de Carvalho.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes protocolos de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis sobre as características de motilidade e integridade de membrana de espermatozóides caprinos criopreservados. Para tal, foram delineados três experimentos. No experimento 1, avaliou-se o efeito de diferentes protocolos de resfriamento sobre a criopreservação de sêmen caprino. Um total de 20 ejaculados de bodes das raças Saanen (n = 2) e Alpina (n = 2) foram congelados utilizando-se um meio à base de leite desnatado-gema, acrescido de 5% de glicerol. Alíquotas do sêmen, então, diluído, foram resfriadas até 5 °C, utilizando dois protocolos de resfriamento diferentes (PR1; média de -0,12 °C/min e PR2; média de -0,4 °C/min), antes de serem congeladas em nitrogênio líquido. O sêmen foi avaliado quanto à sua motilidade espermática progressiva, vigor, taxa de recuperação da motilidade, resposta ao teste hiposmótico (HOST) e coloração. Nesse experimento, a curva de resfriamento PR2 promoveu uma melhor proteção aos efeitos causados pelo choque térmico durante a

criopreservação do sêmen caprino, que a curva PR1. No experimento 2, avaliou-se o efeito de dois períodos de equilíbrio sobre as características de motilidade e integridade de membrana de espermatozóides caprinos criopreservados. Um total de 20 ejaculados de animais da raça Saanen (n = 2) e Alpina (n = 2) foram congelados utilizando-se um meio à base de leite desnatado-gema, acrescido de 5% de glicerol. Alíquotas do sêmen diluído foram, então, resfriadas segundo Fürst (2002), e mantidas a temperatura de 5 °C, por um período de 15 minutos (TE1) ou 75 minutos (TE2) antes de serem congeladas em nitrogênio líquido. O sêmen foi avaliado quanto à sua motilidade espermática progressiva, vigor, resposta ao teste hiposmótico (HOST), ao teste supravital e ao teste de termorresistência (TTR), antes e após o congelamento. Nesse experimento, o tempo de equilíbrio de 75 minutos promoveu uma melhor criopreservação do sêmen caprino que o tempo de equilíbrio curto, de 15 minutos. No experimento 3, avaliou-se o efeito do glicerol e etileno glicol sobre a criopreservação de sêmen caprino, por meio de análises *in vitro* do sêmen. Um total de 20 ejaculados de animais da raça Saanen (n = 2) e Alpina (n = 2) foram congelados utilizando-se um meio à base de leite desnatado-gema, acrescido de 5% de glicerol. Alíquotas do sêmen diluído foram, então, resfriadas, utilizando-se a metodologia descrita por Fürst (2002). O sêmen foi avaliado quanto à sua motilidade espermática progressiva, vigor, resposta ao teste hiposmótico (HOST), ao teste supravital e ao teste de termorresistência (TTR), antes e após o congelamento. Nesse experimento, o uso do EG como crioprotetor permeável promoveu uma melhor proteção à viabilidade da célula espermática, durante o processo de criopreservação, que o glicerol. Em conclusão, o uso do protocolo de resfriamento 2, associado a um período de equilíbrio de 1 hora e ao uso do etileno glycol, promoveu uma melhor proteção das características de motilidade e integridade de membrana, aumentando a viabilidade dos espermatozóides caprinos congelados.

## ABSTRACT

HOVAY, Herbert, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2006. **Effect of different cooling rates, equilibration times and permeating cryoprotectants on deep-freezing of buck spermatozoa.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Advisers: Eduardo Paulino da Costa and Giovanni Ribeiro de Carvalho.

The aim of this study was to evaluate the effect of different cooling rates, equilibration times and permeating cryoprotectants on motility characteristics and plasma membrane integrity of cryopreserved goat spermatozoa. Three experiments were designed. In the first one was evaluated the effect of different cooling methods on goat semen cryopreservation. A total of 20 ejaculates from Saanen (n = 2) and Alpine (n = 2) goats were frozen using a standard dry skim milk yolk diluent with 5% glycerol. Aliquots of the extended semen were then cooled using two different cooling methods (PR1; Becker or PR2; Fürst, 2002), before being frozen in liquid nitrogen. The semen was evaluated by total motility, vigor and the response to hypoosmotic solution test (HOST), live/dead stain and thermo-resistance test (TRT), before and after thaw. In this experiment the cooling method PR2 protected cell viability better than PR1 during the cryopreservation process, reducing cold shock damage and improving the cryosurvival of goat spermatozoa. In the second experiment was evaluated the effect of different equilibration times on motility characteristics



and plasma membrane integrity of cryopreserved goat spermatozoa. A total of 20 ejaculates from Saanen (n = 2) and Alpine (n = 2) goats were frozen using a standard dry skim milk yolk diluent with 5% glycerol. Aliquots of the extended semen were then cooled using the cooling methodology described by Fürst (2002) and remained at the temperature of 5-4 °C by a period of 15 minutes (TE1) or 75 minutes (TE2). The semen was evaluated by total motility, vigor and the response to hypoosmotic solution test (HOST), live/dead stain and thermo-resistance test (TRT), before and after thaw. In this experiment the equilibration time of 75 minutes protected the cell viability better than the period of 15 minutes during the cryopreservation process, improving the cryosurvival of goat spermatozoa. In the third experiment was evaluated the effect of the glycerol (G) and ethylene glycol (EG), on motility characteristics of cryopreserved goat spermatozoa by the *in vitro* semen analyses. A total of 20 ejaculates from Saanen (n = 2) and Alpine (n = 2) goats were frozen using a standard dry skim milk-yolk diluent with 5% glycerol. Aliquots of the extended semen were then cooled using the cooling methodology described by Fürst (2002). The semen was evaluated by total motility, vigor and the response to hypoosmotic solution test (HOST), live/dead stain and thermo-resistance test (TRT), before and after thaw. In this experiment EG promoted a better protection of the spermatic cell viability during the cryopreservation than the G. In conclusion the use of the cooling method PR2 associated with the one hour equilibration period and the ethylene glycol improved the motility characteristics and integrity of plasma membrane, increasing the number of viable goat spermatozoa after cryopreservation.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos caprinos do mundo, com 9,5 milhões de cabeças (IBGE, 2003). Contudo, o País é também um dos maiores importadores de subprodutos dessa espécie. O Brasil possui apenas 1,2% do rebanho caprino mundial, mesmo com condições climáticas e de terra iguais ou superiores aos maiores criadores dessa espécie (FAOSTAT, 2005).

A caprinocultura brasileira apresenta-se muito aquém de seu potencial produtivo, e ainda é de pouca expressão na cadeia do agronegócio brasileiro. Também, a falta de organização das cadeias produtivas, a sazonalidade na oferta de produtos e as baixas escalas de produção e qualidade dos sistemas de produção são problemas que precisam ser resolvidos para que essa atividade possa ocupar um lugar de destaque no agronegócio. Assim, a reestruturação e a organização na cadeia produtiva da caprinocultura brasileira, aliada ao uso de tecnologias produtivas e reprodutivas, podem mudar a atual situação desse setor nos mercados nacional e internacional, trazendo divisas e melhorando a caprinocultura no País.

No Brasil, o uso da inseminação artificial em caprinos encontra-se em estágio incipiente de adoção, e é limitado principalmente por dificuldades inerentes à espécie no processo de criopreservação do sêmen (DUNNER, 1993; MÉNDEZ *et al.*, 1994), havendo baixa disponibilidade de sêmen ou de sêmen de animais não-testados, progênie.

Objetivou-se, com este estudo, desenvolver uma metodologia de criopreservação de sêmen caprino, para que esta possa ser utilizada como uma ferramenta tecnológica no desenvolvimento da caprinocultura brasileira, permitindo o rápido avanço genético e o melhor aproveitamento dos animais com características de produção superiores, assim como a redução nos custos de transporte e a racionalização do uso dos reprodutores.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Inseminação artificial em caprinos

A demanda crescente por animais de elevado mérito genético na pecuária brasileira impulsiona o uso de biotecnologias, principalmente o da inseminação artificial, por esta ser de fácil utilização e ter menor custo de implantação (DUNNER, 1993).

O uso da inseminação artificial permite rápido avanço genético e melhor aproveitamento dos animais com características produtivas superiores, tornando possível a maximização da realização dos testes de progênie, a formação de bancos genéticos, a queda na incidência de doenças sexualmente transmissíveis e a racionalização do uso do reprodutor (AZAWI *et al.*, 1993; MÉNDEZ *et al.*, 1994).

A baixa oferta de reprodutores caprinos faz da biotécnica de inseminação artificial uma ferramenta importante na difusão de germoplasma animal (MACHADO e SIMPLICIO, 1995). A utilização de animais de genética superior, que possam proporcionar maior ganho genético ao rebanho caprino nacional, pode promover maior desenvolvimento do setor, visto que, no Brasil, a caprinocultura se caracteriza pela criação de raças não-especializadas (VASCONCELOS e VIEIRA, 2002).

Apesar da elevada importância no desenvolvimento desse agronegócio, apenas recentemente a prática da inseminação artificial em caprinos tornou-se comercial (AZAWI *et al.*, 1993).

## **2.2 Criobiologia**

Nos últimos 50 anos, o aumento no conhecimento sobre a criobiologia possibilitou melhorar as técnicas de criopreservação de células e tecidos humanos e animais, permitindo a preservação desses por longos períodos de tempo. A criobiologia estuda o efeito das baixas temperaturas sobre sistemas biológicos, visando melhorar a viabilidade de células e tecidos criopreservados. Para tal, faz-se necessário o entendimento dos fatores envolvidos no processo de criopreservação.

### **2.2.1 Biologia espermática**

O espermatozóide é a célula reprodutiva masculina produzida pelos testículos, capaz de fertilizar o ovócito, a célula reprodutiva feminina, e formar o zigoto, dando origem a um novo organismo, a vida. O espermatozóide é uma célula diferenciada, normalmente composta pelas regiões da cabeça, da peça intermediária (PI) e da cauda. A região da cabeça é dividida em quatro sub-regiões (apical, pré-equatorial, equatorial e pós-equatorial), formada por três membranas (plasmática, acrossomal e nuclear), algum citoplasma e pelo material nuclear, no qual estão presentes os cromossomos masculinos, necessários para o processo de fertilização (HAFEZ e HAFEZ, 2002).

Na região da PI há uma grande quantidade de mitocôndrias, responsáveis por prover energia necessária para a movimentação espermática por meio da produção de ATPs. A região da cauda é formada principalmente por um flagelo, composto de microtúbulos e outras estruturas fibrosas, que serve como propulsor na movimentação espermática. No processo de criopreservação, os danos causados a qualquer uma dessas regiões do espermatozóide interferem na viabilidade da célula espermática, comprometendo o resultado do processo de criopreservação.

### **2.2.2 Membrana plasmática**

A membrana plasmática envolve todo o espermatozóide, sendo o componente celular mais externo. A membrana plasmática de qualquer célula é representada por uma estrutura denominada “mosaico fluido”, constituída de uma dupla camada lipídica entremeada por moléculas de proteína (SINGER e NICOLSON, 1972). Esta membrana possui uma estrutura fina, flexível e é seletivamente permeável aos solutos polares (GUYTON e HALL, 1997).

Nos eucariontes os lipídios da membrana são, em sua maioria, glicolipídios, fosfolipídios e colesterol. Os glicolipídios e fosfolipídios são moléculas anfipáticas, formando estruturas micelares ou lamelares quando em meio aquoso. Na membrana plasmática, essas moléculas anfipáticas formam uma estrutura lamelar em bicamada que se fecha em si mesma (SINGER e NICOLSON, 1972; PARKS e GRAHAM, 1992). A membrana plasmática é fluida em virtude da habilidade das moléculas de fosfolipídios movimentarem-se em direção lateral, dentro de cada lâmina da bicamada. A fluidez da membrana plasmática é determinada pela relação dos componentes: colesterol, fosfolipídio e grau de saturação dos ácidos graxos (AMANN e PICKETT, 1987). O maior conteúdo de colesterol, inserido entre as cadeias laterais dos ácidos graxos, e a maior proporção de ácidos graxos saturados:insaturados ditam o estado de solidez e fluidez das membranas.

A superfície da membrana plasmática espermática é contínua e, no entanto, difere regionalmente (FLESH e GADELLA, 2000) quanto à proporção de seus constituintes. A composição de proteínas da membrana varia de acordo com a região do espermatozóide, refletindo uma especialização funcional de cada uma dessas regiões.

Em relação à assimetria dos fosfolipídios, na qual cada tipo de fosfolipídio possui uma orientação específica dentro da bicamada, existe o fato de a quantidade e o tipo de fosfolipídio mudarem de acordo com a espécie animal, o que pode estar relacionado à estabilidade da membrana celular (HAMMERSTED *et al.*, 1990). A assimetria lipídica é muito importante para a função celular. Nas células espermáticas, a assimetria é devida à polaridade dos fosfolipídios de membrana que estão concentrados, em sua grande maioria, na camada interna, devido à ação da enzima aminofosfolipide-

translocase (MULLER *et al.*, 1994). Segundo essas informações, e sabendo que a ação das enzimas é dependente da temperatura, Watson (1995) inferiu que a redução da temperatura durante o processo de criopreservação pode provocar a quebra da assimetria da membrana, em parte devido à alteração na função da enzima aminofosfolipide-translocase.

### **2.2.3 Efeito do resfriamento sobre a membrana plasmática**

Durante o processo de resfriamento ocorre alteração no arranjo da bicamada lipídica. A redução da temperatura faz com que os fosfolipídios da membrana plasmática, cujas cadeias de ácidos graxos são predominantemente poliinsaturadas, assumam uma forma cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são exteriorizadas e as hidrofílicas interiorizadas. Esta formação, denominada hexagonal II ou micela invertida, é transitória até o início da fase cristalina e gel, porém para certos fosfolipídios essa estrutura permanece durante toda a etapa de resfriamento, tornando-se irreversível e impossibilitando a reorganização do arranjo bilaminar da membrana, mesmo após o reaquecimento do espermatozóide à temperatura ambiente (AMANN e PICKETT, 1987).

As alterações físicas e químicas nas membranas celulares, causadas pelo resfriamento, podem levar a danos irreversíveis. Esses podem ser devidos aos danos diretos, à ruptura de membranas; ou indiretos, causados pela diminuição dos processos metabólicos (GRAHAM, 1996). A alteração na fluidez e na permeabilidade da membrana compromete a fertilidade do espermatozóide, devido aos danos causados no acrossoma e à redução da atividade metabólica e do consumo de ATP (WEITZE e PETZOLD, 1992).

### **2.3. Taxas de resfriamento e tempos de equilíbrio utilizados na criopreservação do sêmen caprino**

A curva de resfriamento é considerada o principal entrave no processo de criopreservação do sêmen (WATSON, 1981). Durante o resfriamento, a taxa de queda de temperatura entre 19 e 8°C é um importante fator na ocorrência

de alterações morfológicas e funcionais do espermatozóide, devido à ocorrência de mudanças irreversíveis na atividade metabólica da membrana plasmática do espermatozóide, levando à ruptura e perda de componentes celulares (GRAHAM, 1996).

O uso de curvas de resfriamento rápida (queda maior que 1 °C/mim), média (queda entre 1 – 0,3 °C/mim) e lenta (queda menor que 0,3 °C/mim) é descrito na literatura, principalmente em eqüinos (JASKO *et al.*, 1991). Segundo os autores, o uso de curvas de congelamento lento é somente necessário durante a faixa de temperatura na qual a célula espermática é mais suscetível ao choque térmico, entre 15 e 0 °C, diminuindo assim os danos.

O período de equilíbrio é o tempo no qual o espermatozóide permanece à temperatura de 4 – 5 °C antes do congelamento (WIGGIN e ALMQUIST, 1974). Esse tempo é necessário para que os espermatozóides interajam com os constituintes do meio (gema de ovo e crioprotetores) e esses adquiram máxima resistência aos danos causados à célula espermática pelo processo de criopreservação (BOUCHARD *et al.*, 1990; ENGLAND, 1993). Diferentes períodos de equilíbrio são descritos para criopreservação do sêmen caprino (SAHNI e ROY, 1972; WAIDE *et al.*, 1977; DEKA e RAO, 1986), eqüino (FURST, 2002), bovinos (JONDET, 1967; WIGGIN e ALMQUIST, 1974). Segundo Deka e Rao (1986), essa diversidade pode ser devido às diferenças na composição dos meios de congelamento, utilizados nas diferentes espécies. Segundo Das e Rajknovar (1995) e Dutta *et al.* (1996), o período de equilíbrio ideal para o congelamento de sêmen caprino encontra-se entre 1 e 4 horas. No entanto, Ritar *et al.* (1990) sugerem que o sêmen caprino pode ser criopreservado sem o uso do tempo de equilíbrio, quando se utiliza um tempo de resfriamento de 1 – 1,5 hora (30 °C a 4-5 °C).

#### **2.4 Diluentes utilizados na criopreservação do sêmen caprino**

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



criopreservação dos espermatozóides (AZAWI *et al.*, 1993). O diluente de congelamento ideal deve conter uma combinação adequada de nutrientes; conter crioprotetores, utilizados para minimizar os efeitos do resfriamento, congelamento e aquecimento; manter a pressão osmótica e o balanço eletrolítico do meio; e conter antibióticos, a fim de inibir o crescimento bacteriano (MEMON e OTT, 1981). Conseqüentemente, é possível maximizar a habilidade de fertilização, diminuir as perdas no descongelamento e aumentar o sucesso da inseminação artificial (DUNNER, 1993).

Muitos meios diluidores, em combinação com crioprotetores, são utilizados no processo de congelamento e descongelamento do sêmen caprino: diluentes à base de lactose (MEMON *et al.*, 1981), água de coco (MACHADO e SIMPLICIO, 1995), Tris (DROBNIS *et al.*, 1980; DEKA e ROY, 1985a) e leite desnatado em pó e reconstituído (CORTEEL, 1974). Entretanto, resultados conflitantes foram obtidos quanto à viabilidade da célula espermática criopreservada, comparando o uso desses diferentes diluidores (DAS e RAJKONWAR, 1995).

## **2.5 Crioprotetores permeáveis utilizados na criopreservação do sêmen caprino**

O glicerol (G) foi o primeiro crioprotetor utilizado no congelamento de sêmen, e até hoje é o mais utilizado no congelamento de sêmen caprino (BARBOSA, 1999; LEBOEUF *et al.*, 2000). O mecanismo exato pelo qual o glicerol protege as células dos danos de congelamento e descongelamento não é completamente entendido. Amann e Pickett (1987) sugerem que o maior efeito benéfico do glicerol é extracelular. Contudo, também penetra e confere proteção à membrana celular (PARKS e GRAHAM, 1992), reduzindo o número de poros e suas funções ATP-dependentes e promovendo, assim, a agregação protéica e a formação de blocos de lipídeos (ANGOLA, 1994). Apesar de seus efeitos essenciais no processo de criopreservação celular, o glicerol pode também produzir efeitos adversos nos espermatozóides, por apresentar graus de toxicidade dependentes da concentração utilizada do crioprotetor (PARKS e GRAHAM, 1992; ANGOLA, 1994).

O etileno glicol (EG) é um agente crioprotetor do grupo dos álcoois, assim como o glicerol, que vem sendo utilizado no congelamento de sêmen em caprinos, em substituição ao glicerol (SOUZA *et al.*, 2002; BITTENCOURT *et al.*, 2004). O EG possui menor peso molecular e toxicidade do que o glicerol. Essas características, associadas à sua alta permeabilidade celular, fazem do EG o crioprotetor adequado para os processos de congelamento e vitrificação de embriões (MASSIP, 2001).

O uso do EG como meio crioprotetor na criopreservação de espermatozoides caprinos ainda é pouco citado na literatura. Souza *et al.* (2002) compararam o efeito do G e EG, ambos a 7%, no congelamento de sêmen caprino. O sêmen criopreservado com glicerol apresentou maior taxa de motilidade no pós-descongelamento. Constatou-se que não houve diferenças morfológicas entre o sêmen dos animais nos tratamentos, corroborando os dados encontrados por Bittencourt *et al.* (2004), que observaram maior índice de alterações patológicas no grupo que continha o glicerol como agente crioprotetor.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, p. 147, 1987.

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

BARBOSA, L. P. **Avaliação de diferentes diluentes e metodos de congelamento de semen, em programas de inseminação artificial em caprinos da raça Alpina**. 1999. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R. B. S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A. P.; ALVES, S. G. G.; ALMEIDA, A. K.; GUIMARAES, J. D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação de semen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004

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

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

DEKA, B. C.; RAO, A. R. Effect of glycerol level in Tris based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. **Theriogenology**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 1985.

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

DUTTA, S.; GHOSH, B. B.; BONDYOPADHYAY, S. K. *et al.* Effect of different extenders, glycerol levels and equilibration times on deep-freezing of buck semen. **Indian J. Animal Health**, v. 35, p. 35-38, 1996.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v. 47, p. 243-255, 1993.

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>>. Acesso em: 21 jun. 2006.

FLESH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim. Biophys.**, v. 14, p. 197-235, 2000.

FÜRST, R. **Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade**. 2002. 46 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

GRAHAM, J. K. Current techniques for freezing equine semen. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa, 1995-1996. **Proceedings...** Fort Collins-Co, 1996.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. Ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1997. p. 1014.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in farm animals**. 7. Ed., 2002. 509 p.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 jun. 2006.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinária**, v. 10, p. 156-165, 1994.

JONDET, R. Influence du temps d'équilibration sur la congélation et le pouvoir fécondant du sperme taureau. **C. R. Acad. Agr. Fr.**, v.53, p.1407, 1967.

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

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

MASSIP A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reprod. Dom. Ani.**, v. 36, p. 49-55, 2001.

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

MÉNDEZ, J. V.; HERRERA, G. G.; GARCÍA, M. E. G.; GONZÁLEZ, A. T. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0,25 ml y 0,5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. **Vet. Méx.**, v. 25, n. 2, p. 127-131, 1994.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/estatisticas/pecuaria/3.6.XLS>>.. Acesso em: 22 jun. 2006.

MULLER, K.; POMORSKI, T.; MULLER, P.; ZACHOWSKI, A.; HERRMANN, A. Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetry transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. **Biochemistry**, v. 33, p. 9968-9974, 1994.

NOGUEIRA FILHO, A. **Considerações sobre ovinocaprinocultura**. Fortaleza: Banco do Nordeste - ETENE, 1997.

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

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **J. Reprod. Fert.**, v. 60, p. 403-407, 1980.

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

SAHNI, K. L.; ROY, A. A stud on the effect of deep freezing (-79°C) on post thawing revival of sheep and goat spermatozoa. **Indian J. Anim. Sci.**, v. 42, p. 102-105, 1972.

SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972.

SOUZA, A. F.; GUERRA, M. M. P.; BATISTA, A. M.; MERGULHÃO, F. C. C.; NEVES, A. C.; WISCHRAL, A. Congelação de semen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etileno glicol. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Supl., v. 5, p. 103-105, 2002.

VASCONCELOS, V. R.; VIEIRA, L. S. Disponível em:  
<<http://www.fmvz.unesp.br/ovinos/utilid11.htm>> Acesso em: 13 jun. 2005.

WAIDE, Y.; NIWA, T.; ASANUMA, R. Studies on preservation of liquid and frozen semen of domestic animals. 3. Viability and fertility of frozen goat semen. **Japanese J. Anim. Reprod.**, v. 23, p. 129-137, 1997.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.) **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p. 189.

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

WEITZE, K. F.; PETZOLDT, R. Preservation of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 2229-235, 1992.

WIGGIN, H. B.; ALMQUIST, J. O. Combinations of glycerol percent, glycerol equilibrium time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. **J. Dairy Sci.**, v. 58, n. 3, p. 416-419, 1974.

## EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE RESFRIAMENTO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINOS

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes protocolos de resfriamento (de 24 a 5 °C) sobre as características de motilidade e integridade de membrana de espermatozóides caprinos criopreservados. No total, foram congelados 20 ejaculados de bodes das raças Saanen (n=2) e Alpina (n=2), utilizando-se um meio à base de leite desnatado-gema, acrescido de 5% de glicerol. Alíquotas do sêmen, então diluído, foram resfriadas até 5 °C, utilizando dois protocolos de resfriamento diferentes (PR1; média de -0,12 °C/min e PR2; média de -0,4 °C/min), antes de serem congeladas em nitrogênio líquido. O sêmen foi avaliado quanto a sua motilidade espermática progressiva, vigor, taxa de recuperação da motilidade, resposta ao teste hiposmótico (HOST), coloração supravital e teste de termorresistência (TTR), antes e após o congelamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste F, a 5% de significância. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as raças na avaliação das características seminais do sêmen fresco. A PR2 resultou em maior ( $P < 0,05$ ) motilidade espermática progressiva (46 x 38%), taxa de recuperação da motilidade (54 x 44%) e porcentagem de células vivas (42 x 31%) após o descongelamento. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no vigor e HOST entre os tratamentos. A motilidade espermática progressiva avaliada pelo TTR no tempo 0 e 30 minutos foi maior ( $P < 0,05$ ) para a PR2 que para a PR1, no entanto não diferiu ( $P > 0,05$ ) nos tempos de 1 e 2 horas após o descongelamento. As características morfológicas não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os métodos de resfriamento. Concluindo, a curva de resfriamento PR2 promoveu melhor proteção aos efeitos causados pelo choque térmico durante a criopreservação do sêmen caprino que a curva PR1.

**Palavras-chave:** caprino, criopreservação, taxas de resfriamento, sêmen.

## EFFECT OF DIFFERENT COOLING RATES ON GOAT SEMEN CRYOPRESERVATION

**ABSTRACT:** The aim of this study was to evaluate the effect of different cooling rates (between 24 and 5 °C) on motility characteristics and plasma membrane integrity of cryopreserved goat spermatozoa. A total of 20 ejaculates from Saanen (n = 2) and Alpine (n = 2) goats were frozen using a standard dry skim milk yolk diluent with 5% Glycerol. Aliquots of the extended semen were then cooled using two different cooling methods (PR1; Becker or PR2; Fürst, 2002), before being frozen in liquid nitrogen. The semen was evaluated by total motility, vigor and the response to hypoosmotic solution test (HOST), live/dead stain and thermo-resistance test (TRT), before and after thaw. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and the differences between treatments were analyzed by F's test at 5% of significance. There were no differences ( $P > 0.05$ ) in fresh semen physical (volume, concentration, vigor and total and progressive motility) and morphological characteristics between breeds. The PR2 method resulted in the highest ( $P < 0.05$ ) total motility (46 x 38%) and percentage of live cells (42 x 31%) after thaw. No difference ( $P > 0.05$ ) was observed to semen vigor and HOST between the treatments. The total motility evaluated by TRT on time zero and 30 minutes after thaw was higher ( $P < 0.05$ ) with PR2 than with PR1, but showed no difference ( $P > 0.05$ ) at 1 and 2 hours after thaw. The morphological characteristics did not differ between the methods after semen thaw ( $P > 0.05$ ). In conclusion, the cooling method PR2 protected cell viability better than PR1 during the cryopreservation process, reducing cold shock damage and improving the cryosurvival of goat spermatozoa.

**Keywords:** caprine, cooling rate, cryopreservation, semen.



## 1. INTRODUÇÃO

O processo de criopreservação submete as membranas plasmáticas dos espermatozóides a condições adversas durante as diferentes etapas, levando à redução na viabilidade da célula espermática (PARKS e GRAHAM, 1992). O resfriamento do sêmen é o primeiro estresse térmico pelo qual a célula espermática passa durante o processo de criopreservação (SQUIRES *et al.*, 1999).

O choque térmico refere-se à maior sensibilidade peculiar dos espermatozóides ao resfriamento e ocorre na faixa de temperatura de 19 a 8 °C (MORAN *et al.*, 1992), alterando as propriedades biofísicas, a permeabilidade das membranas plasmáticas e, conseqüentemente, a função celular (AMANN e PICKETTI, 1987). O choque térmico causa danos irreversíveis ao espermatozóide, e caracteriza-se por: movimentação anormal; redução da motilidade espermática progressiva e regressiva; danos à membrana acrossomal e plasmática; redução no metabolismo; e perda de constituintes celulares (GRAHAM, 1996).

A severidade do efeito do choque térmico sobre a célula é dependente da taxa de resfriamento (WATSON, 1995), e este efeito sobre a viabilidade celular é minimizado pelo controle da taxa de resfriamento entre a zona de choque térmico (20 – 8° C) e pela adição de lipídeos e, ou, lipoproteínas ao meio diluidor (GRAHAM, 1996).

O uso de taxas de resfriamento na faixa de temperatura de 15 a 0° C causa danos irreversíveis aos espermatozóides criopreservados, quando resfriados rapidamente, devido à ruptura das membranas e às perdas dos constituintes intracelulares, levando à inviabilidade da célula (QUINN *et al.*, 1995). Taxas de resfriamento lentas (< 0,1 °C/minuto) entre as temperaturas de 20 a 4 °C, no entanto, demonstraram ser efetivas para minimizar os danos causados pelo choque térmico em espermatozóides eqüinos (KAYSER *et al.*, 1992).

Poucos experimentos sobre criopreservação de sêmen caprino relatam a metodologia utilizada no resfriamento. Em sua maioria, limitam a descrever o tempo de resfriamento-equilíbrio (BARBOSA, 1999; FERRARI e BARNABÉ, 1999; SANTOS, 2001; SOUZA *et al.*, 2002; BITTENCOURT *et al.*,

2004). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de duas diferentes metodologias de resfriamento sobre a criopreservação de sêmen caprino, por meio de análises *in vitro* do sêmen.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, situado a 20°45'20" latitude S e 42°52'40" W. Gr, a uma altitude média de 752 m. O período experimental compreendeu os meses de julho e agosto (período de início do anestro sazonal) de 2005

Foram utilizados quatro bodes, clinicamente sadios e maduros sexualmente, das raças Pardo Alpino (n=2) e Saanen (n=2). Os animais foram mantidos durante todo o período experimental. Os animais foram submetidos a exame andrológico prévio, tendo sido analisados os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen. Todos os semens estavam dentro do padrão considerado normal para a espécie (CBRA, 1998).

As coletas foram realizadas com intervalo de dois dias, utilizando como manequim uma fêmea em estro induzido. Foram realizadas cinco coletas por reprodutor, totalizando 20 coletas para o período experimental. Após a coleta, pelo método da vagina artificial, os ejaculados foram encaminhados ao laboratório de processamento e colocados em incubação a 37° C, em banho-maria, tendo sido realizado então o exame físico (volume, vigor e motilidade espermática progressiva) e morfológico do sêmen, para avaliação das características seminais, segundo CBRA (1998). A integridade funcional e estrutural da membrana plasmática foi avaliada pelo teste hipoosmótico (FONSECA *et al.*, 2001) e pelo teste supravital, também conhecido como coloração de vivos/mortos.

Após a avaliação, o sêmen foi diluído em solução de Ringer-Lacato®, na proporção de um volume de sêmen para nove de Ringer, e centrifugado a 600 G por 10 minutos, para retirada do sobrenadante, ou seja, do plasma seminal. Após a centrifugação e retirada do líquido sobrenadante, o pellet de sêmen foi então rediluído com diluente leite de desnatado-gema (MIES FILHO,

1982), acrescido de 5% de glicerol, na proporção de um volume de sêmen para um volume de diluidor. Após a pré-diluição foi acrescentado o volume de diluidor suficiente para o ajuste da concentração total de espermatozoides de 200 milhões por mL, e dose inseminante de 50 milhões espermatozoides. Após a rediluição, o sêmen foi envasado em palhetas de polietileno de 0,25 mL, mantidas a temperatura ambiente, para ambos os procedimentos de resfriamento. O processamento inicial do sêmen, da coleta até que o sêmen fosse submetido ao resfriamento, não excedeu o tempo de 20 minutos.

O sêmen foi submetido a dois protocolos de resfriamento. No primeiro tratamento, protocolo de resfriamento 1 (PR1), metade das palhetas foi colocada em um tubo de ensaio de vidro (15 mL) e hermeticamente fechado. Posteriormente, o tubo de ensaio foi colocado no interior de um béquer de vidro (250 mL) contendo 250 mL de água, ambos pré-aquecidos a 37 °C, e levado ao interior de uma geladeira, à temperatura de 5 °C, por 2 horas.

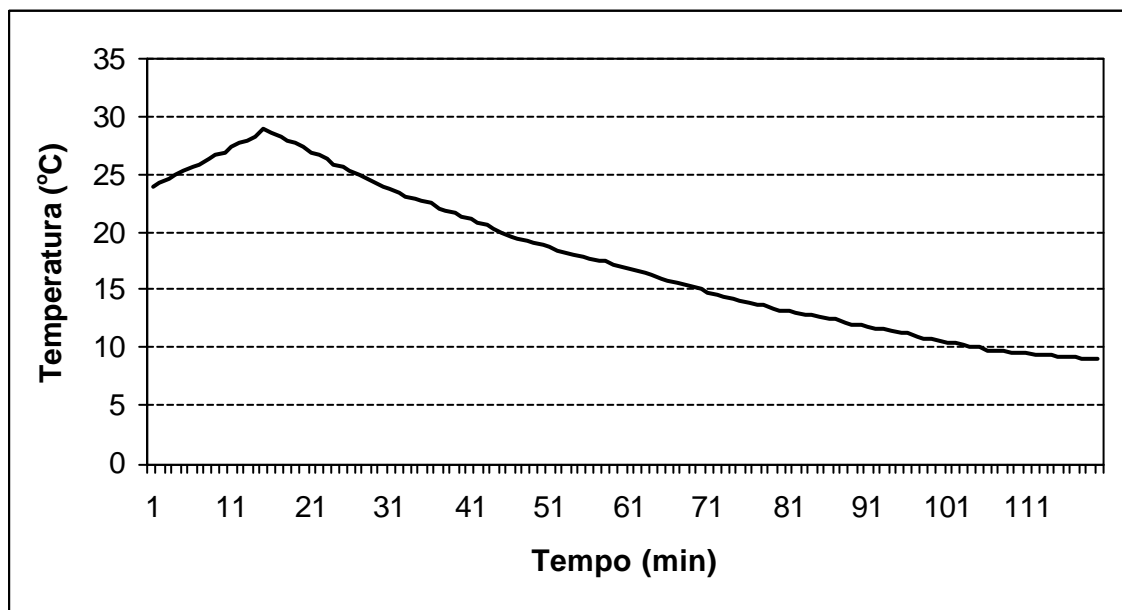


Figura 1 – Curva de resfriamento 1 (PR1), taxa de resfriamento em função do tempo.

No segundo tratamento, curva de resfriamento 2 (PR2; Figura 2), a outra metade das palhetas foi colocada em um tubo de ensaio de vidro (15 mL), que foi hermeticamente fechado. Posteriormente, o tubo de ensaio foi colocado no interior de uma mamadeira plástica (240 mL) contendo 120 mL de álcool absoluto, ambos mantidos à temperatura ambiente (24 °C), e levado ao interior de uma geladeira, à temperatura de 5°C, por 1 hora, seguindo a curva de resfriamento (45 minutos) e tempo de equilíbrio (15 minutos), como descrito por Fürst (2002).

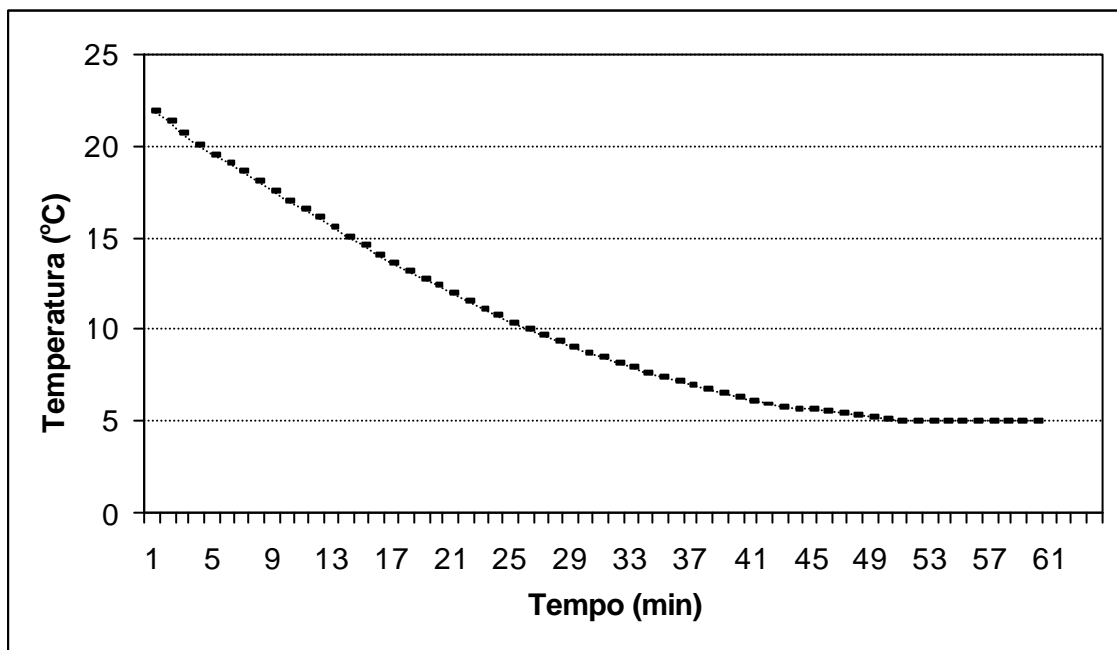


Figura 2 – Curva de resfriamento 2 (PR2), taxa de resfriamento em função do tempo (Fonte: adaptado de Fürst, 2002).

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas que estavam em equilíbrio a 5 °C no interior de um botijão de nitrogênio, à altura de 5 cm de altura do nitrogênio por 15 minutos (BETINI et al., 1998). Após este período, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido. A seguir, as palhetas foram acondicionadas em *canister* apropriado, e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido, até a sua avaliação.

As amostras de sêmen, resfriadas em ambos os protocolos, foram avaliadas após a coleta, e o descongelamento realizado em banho-maria a 37 °C, por 30 segundos. A motilidade e o vigor, a característica morfológica e a

integridade estrutural (teste de vivos/mortos) e funcional (HOST) foram avaliadas segundo metodologia anteriormente citada. A taxa de recuperação da motilidade (TRMot) foi calculada pela divisão entre a motilidade espermática progressiva do sêmen descongelado e a motilidade espermática progressiva do sêmen a fresco, multiplicando-se o resultado por 100 (ABOAGLA e TEREDA, 2003)

A longevidade dos espermatozóides foi avaliada em todas as amostras de sêmen descongeladas pelo teste de termorresistência (TTR), que consistiu em colocar uma amostra de sêmen de 0,2 mL, em um frasco de *ependorf* de 1,5 mL, e incubado a 37 °C, por um período de 120 minutos. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados pelo TTR nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos.

Os dados obtidos para as características estudadas foram submetidos ao teste de normalidade (teste de LILLIEFORS) e homocedasticidade (teste de COCHRAN). Posteriormente, foram submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. A variável vigor espermático foi submetida ao teste não-paramétrico de Wilcoxon, para comparação das médias dos tratamentos. As análises foram todas realizadas por meio do programa estatístico SAEG 9.0.

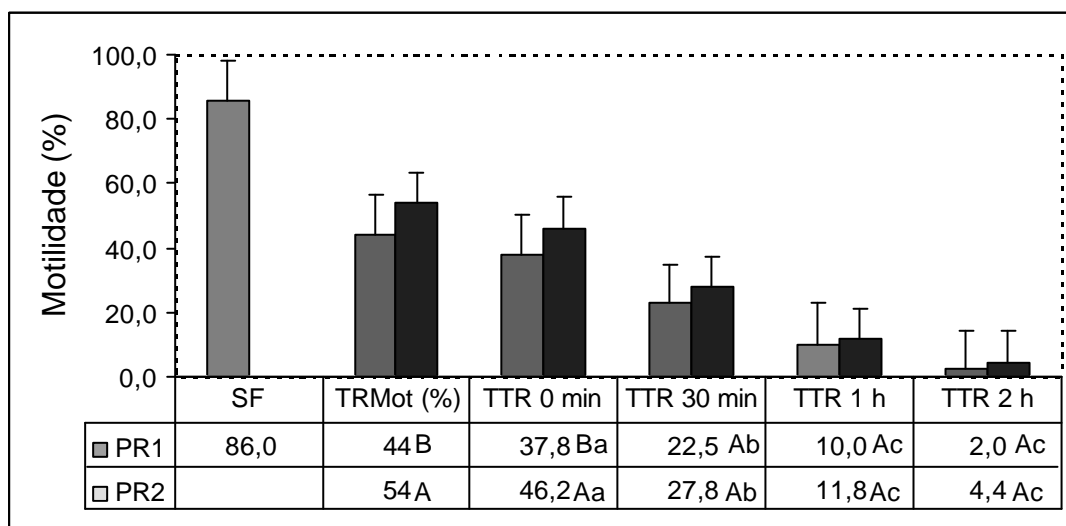
### 3. RESULTADOS

As características seminais do sêmen fresco dos reprodutores utilizados neste experimento, observadas na Tabela 1, estavam condizentes com os parâmetros considerados normais para a espécie caprina (BETINI *et al.*, 1998; AZERÊDO *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2001). Todos os ejaculados foram considerados aptos para serem criopreservados (CBRA, 1998).

Após o descongelamento, a motilidade espermática total, avaliada no TTR no tempo zero (54 x 44%), e a taxa de recuperação da motilidade (46,2 x 37,8%) foram maiores ( $P < 0,05$ ) nas amostras de sêmen resfriadas no PR2, quando comparada com a motilidade das amostras resfriadas na PR1 (Figura 3). No entanto, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos quanto à motilidade espermática total avaliada pelo TTR nos tempos de 30 (27,8 x 22,5%), 60 (11,8 x 10%) e 120 (4,4 x 2%) minutos, para PR2 e PR1,

Tabela 1 – Características seminais de bodes das raças Pardo Alpino e Saanen, doadores de sêmen para experimentação em criopreservação espermática

Características Seminais	Animais			
	Raça Pardo Alpino		Raça Saanen	
	Bode 01	Bode 02	Bode 03	Bode 04
<b>FÍSICAS</b>				
Volume (mL)	0,7 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,3
Motilidade (%)	86,0 ± 4,	82,0 ± 7,5	86,0 ± 4,1	86,0 ± 4,1
Vigor (0-5)	4,0 ± 0,8	3,5	3,8 ± 0,6	3,8 ± 0,8
Concentração (x10 <sup>9</sup> eptz/mL)	2,2 ± 0,7	2,1 ± 0,5	2,0 ± 0,4	2,1 ± 1,2
<b>MORFOLÓGICAS</b>				
Defeitos Totais (%)	0,8 ± 1,7	2,6 ± 1,6	4,0 ± 1,3	2,2 ± 1,3
<b>INTEGRIDADE DE MEMBRANA</b>				
HOST (%)	69,4 ± 12,2	67,6 ± 11,7	55,4 ± 12,2	61,4 ± 9,8
Vivos/mortos (%)	92,6 ± 02,8	88,8 ± 07,8	89,8 ± 4,3	89,0 ± 7,4



<sup>A,B</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste F.

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste F.

Figura 3 – Valores médios (%) e desvios-padrão da motilidade espermática progressiva para o sêmen fresco (SF) e para o teste de termo-resistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação, e da taxa de recuperação de motilidade (TRMot), submetidos a diferentes protocolos de resfriamento.

respectivamente. A motilidade espermática progressiva avaliada nos diferentes tempos do TTR, dentro de cada metodologia de resfriamento, foi maior ( $P < 0,05$ ) para o tempo zero e 30 minutos que para os tempos de 1 e 2 horas.

O vigor espermático não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os diferentes métodos de resfriamento dentro de cada tempo de avaliação no TTR (Figura 4), entretanto o vigor espermático diminuiu em função do tempo de avaliação do TTR, para ambos protocolos.

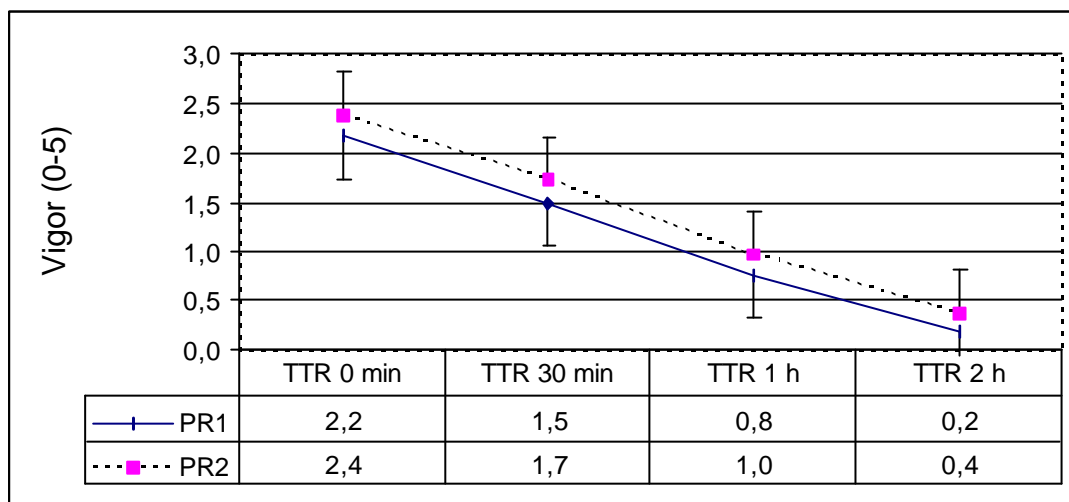
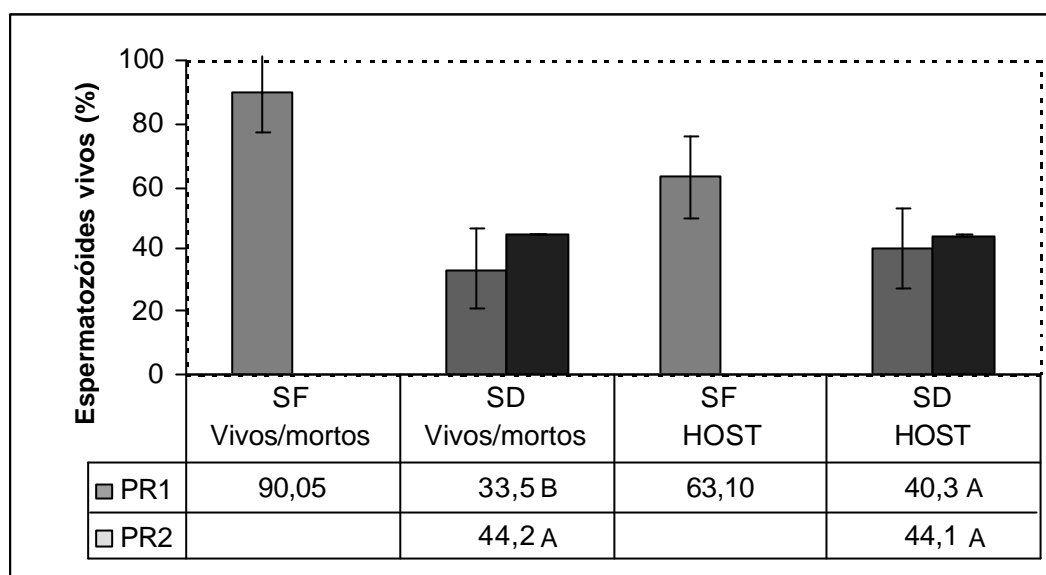


Figura 4 – Valores médios e desvios padrão do vigor espermático, durante o teste de termorresistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação, submetido a diferentes métodos de resfriamento. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no vigor espermático entre os protocolos de resfriamento avaliados pelo teste F.

A porcentagem de espermatozóides vivos, avaliada pelo teste supravital, foi maior nas amostras de sêmen resfriadas na PR2, quando comparada com a motilidade das amostras resfriadas na PR1 ( $P < 0,05$ ; Figura 5). Não houve diferença entre as metodologias quanto à reatividade da membrana da cauda do espermatozóide ao HOST ( $P > 0,05$ ).

Não houve diferença entre as metodologias de resfriamento quanto às características morfológicas do sêmen após o processo de criopreservação ( $P > 0,05$ ; Tabela 2). No entanto, a porcentagem de defeitos totais aumentou em ambas as metodologias de resfriamento após a criopreservação. Este aumento foi devido, principalmente, ao aumento na porcentagem de lesões no acrossoma das células espermáticas.



<sup>A,B</sup> Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste F.

Figura 5 – Valores médios (%) e desvios-padrão do sêmen fresco (SF) e descongelado (SD) de espermatozoides vivos e com membrana plasmática da cauda funcional, avaliados pelo teste supravital e pelo teste hiposmótico (HOST), respectivamente, submetidos aos diferentes protocolos de resfriamento.

Tabela 2 – Valores médios e desvios-padrão de defeitos de acrossoma e defeitos espermáticos totais do sêmen de bodes das raças Pardo Alpina e Saanen submetido à criopreservação, utilizando-se dois diferentes protocolos de resfriamento

Características Morfológicas (%)	Método de Resfriamento	
	PR1	PR2
Acrossoma	7,7 ± 4,9	7,2 ± 4,0
Total defeitos	11,3 ± 5,7	11,5 ± 4,7

\* Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste F.

#### 4. DISCUSSÃO

Os dois protocolos de resfriamento utilizados neste experimento tiveram o mesmo padrão na queda de temperatura, tendo sido mais acentuada inicialmente, até a temperatura de 15 °C, e mais suave até a temperatura de 9 - 5 °C. Segundo Quinn *et al.* (1995), isso evita a ruptura das membranas e



perdas dos constituintes intracelulares, levando à inviabilidade da célula espermática. No entanto, apesar de ambas as curvas possuírem padrão semelhante, a taxa de resfriamento média foi de  $-0,12$  e de  $-0,4$  °C/mim, para PR1 e PR2, respectivamente. Assim, a PR2 alcançou a temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$  em torno de 45 minutos, o que permitiu um tempo de equilíbrio de 15 minutos, enquanto a PR1 alcançou a temperatura de  $8^{\circ}\text{C}$  em aproximadamente 120 minutos.

A diferença nas curvas, ou taxas, possivelmente aconteceu por dois motivos principais: 1) pela diferença na temperatura do líquido presente no interior das duas câmaras de resfriamento no início das curvas, PR1 ( $37^{\circ}\text{C}$ ) e PR2 ( $24^{\circ}\text{C}$ ), o que fez com que nos primeiros 15 minutos da PR1 houvesse aumento da temperatura em que o sêmen se encontrava, de 24 para  $29^{\circ}\text{C}$ , antes que fosse iniciada a queda na temperatura; 2) devido ao tipo de líquido contido no interior das câmaras de resfriamento, PR1 (água) e PR2 (álcool), visto possuírem diferentes capacidades de distribuição de calor.

O menor tempo utilizado para atingir a temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$  pela PR2 pode ter sido benéfico à célula espermática, por ter diminuído mais rapidamente o metabolismo e mantido por mais tempo suas reservas energéticas, influenciando positivamente a motilidade espermática progressiva espermática após o descongelamento. No entanto, segundo England (1993), é durante os períodos de resfriamento e equilíbrio do sêmen que as células espermáticas adquirem resistência aos efeitos do congelamento, permitindo maior interação entre os espermatozóides e os componentes do meio. Dessa maneira, poder-se-ia esperar que a metodologia utilizada na PR1, de 2 horas, tivesse melhor taxa de sobrevivência ao processo de criopreservação que a PR2, de 1 hora, o que não ocorreu.

A taxa de recuperação, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático pós-descongelamento encontrados neste estudo, para as diferentes metodologias, estão de acordo com as exigências para utilização de sêmen criopreservado do CBRA (1998) e dentro dos valores médios encontrados para sêmen caprino (BARBOSA, 1999; SANTOS *et al.*, 2001; ABOAGLA e TERADA, 2003; SILVA, 2004; FERRARI e BARNABE, 1999; AZEREDO *et al.*, 2001; BITTENCOURT *et al.*, 2004).

A metodologia de resfriamento e, ou, a descrição da taxa de resfriamento e do tempo de equilíbrio utilizado por alguns autores não é descrita em seus estudos, dificultando uma possível comparação, resguardando o uso de diferentes diluentes, crioprotetores e metodologias de congelamento utilizadas por cada autor. Santos *et al.* (2001) utilizaram uma curva média de  $-1,07^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , e um período de equilíbrio de 1,5 hora na criopreservação de espermatozóides caprinos. Essa curva foi obtida pela colocação do sêmen, ainda não envasado, sobre um balcão (freezer) com a temperatura estabilizada em  $4^{\circ}\text{C}$ . A taxa média de recuperação da motilidade espermática e a motilidade espermática progressiva pós-descongelamento encontrada por Santos (2001) foi de 44,0 e 34,8%, respectivamente. Já Silva (2004), utilizando a metodologia de resfriamento descrita por Bueno (2000), com modificações, obteve uma taxa média de recuperação da motilidade espermática de 67% e a motilidade espermática progressiva de 61% em cães.

A longevidade dos espermatozóides pós-criopreservação foi avaliada nas amostras de sêmen pelo teste de termorresistência lento de 2 horas, segundo metodologia do CBRA (1998). Tanto o vigor quanto a motilidade espermática, independentemente da metodologia de resfriamento utilizada, apresentaram comportamento semelhante ao TTR, em função do tempo de avaliação, permanecendo alto nos primeiros 30 minutos do teste, caindo na primeira hora e, posteriormente, nas horas finais do teste, estabilizando em valores baixos. Contudo, o sêmen criopreservado, utilizando a metodologia PR2, obteve maior motilidade ( $P < 0,05$ ) no tempo zero e 30 minutos do TTR.

Os valores de motilidade espermática progressiva e vigor espermático encontrados neste experimento estão de acordo com as normas para aprovação do sêmen para uso do sêmen criopreservado (CBRA, 1998), no entanto, a longevidade está aquém dos valores encontrados por outros autores (MACLAUGHLIN *et al.*, 1992; BARBOSA, 1999; SILVA, 2004). Barbosa (1999) encontrou valores acima de 30% de motilidade e de vigor após o TTR de 2 horas.

Houve baixa longevidade espermática, avaliada pelo TTR, neste estudo, quando comparado a outros estudos (BARBOSA, 1999; SILVA, 2004). Segundo Rota *et al.* (1999), o curto período de sobrevivência após o descongelamento limita a fertilidade do sêmen. Esta limitada sobrevivência pode ser causada por dois fatores: 1) danos causados à célula durante o processo de criopreservação, alteração na organização e permeabilidade da membrana plasmática, na função mitocôndrial; e 2) devido há alguns cuidados que deveriam ter sido tomados, mas que não foram, na realização do TTR, como: cobertura do sêmen por uma película de óleo mineral, para evitar a evaporação e, ou, diluir a amostra a ser avaliada, permitindo maior nutrição à célula espermática e a diminuição da concentração de crioprotetores no meio, visto serem estes tóxicos à célula.

O teste hipoosmótico é utilizado para avaliar uma das propriedades das membranas biológicas, o transporte seletivo de substâncias, que somente ocorre de maneira eficiente nas células com membranas plasmáticas íntegras (JEYENDRAN *et al.*, 1984). Portanto, naquelas células que sofreram alguma alteração na estrutura funcional da cauda do espermatozóide, principalmente, pode-se esperar que sua resposta ao HOST, caracterizada pelo dobramento de cauda, não ocorra.

Não houve diferença entre as duas metodologias de congelamento quanto à avaliação da membrana pelo HOST. No entanto, o processo de criopreservação reduziu em 33% a integridade de membrana após o descongelamento, quando comparada com a mesma a fresco. Este valor está de acordo com os resultados obtidos por Santos (2001), 28% de reação ao HOST.

Entre as metodologias de resfriamento (PR1 e PR2) houve diferença ( $P < 0,05$ ) após o descongelamento do sêmen no resultado do teste de vivos/mortos, sendo o valor mais alto encontrado para a PR2. Como o meio diluidor foi o mesmo utilizado para ambos os tratamentos, acredita-se que esta diferença seja causada pela maior capacidade da PR2 em minimizar os efeitos do choque térmico sobre integridade da membrana.

A avaliação das características morfológicas do sêmen revelou que não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os semens de PR1 e PR2 após o processo de criopreservação, porém a integridade do acrossoma dos espermatozoides diminuiu em ambas as curvas após a congelação/descongelação. A maioria

das lesões observadas nos acrossomos foi o edema de acrossoma. Logo após o descongelamento do sêmen houve decréscimo de 10% na integridade acrossomal, com relação aos valores iniciais encontrados para o sêmen a fresco, podendo-se observar edemaciamento severo de alguns espermatozóides. Segundo Strom *et al.* (1993), o processamento do sêmen é responsável pelo aparecimento de lesões graves no acrossoma.

Mesmo havendo aumento nas alterações de morfologia, os valores apresentados estão próximos dos encontrados por outros autores (SANTOS, 2001; AZEREDO *et al.*, 2001; FÜRST 2002) e de acordo com as normas de utilização do sêmen congelado, segundo CBRA (1998).

## 5. CONCLUSÕES

As análises realizadas para avaliar o efeito de duas diferentes metodologias de resfriamento sobre a criopreservação do sêmen caprino demonstraram que a PR2 é mais eficiente em preservar a viabilidade da célula espermática que a PR1.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOAGLA, E.M.E.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, n. 69, p. 1245-1250, 2003.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, p. 147, 1987.

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

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

BETINI, C. M.; MORAES, G. V.; RIGOLON, C. R. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. **Acta Scientiae**, v. 20, n. 3, p. 361-365, 1998.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; FÜRST, R.; TEIXEIRA, R. B. S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A. P.; ALVES, S. G. G.; ALMEIDA, A. K.; GUIMARAES, J. D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação de semen caprino. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.

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

BUENO, R. **Criopreservação de semen caprino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento**. 2000. 91 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. Eed. Belo Horizonte, 1998. p. 25-27.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprodu. Fert Suppl.**, v. 47, p. 243-255, 1993.

FERRERI, S.; BARNABE, V. H. Efeito de diferentes diluidores e métodos de congelação na qualidade do semen criopreservado de caprinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 36, n. 4, 1999.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F. *et al.* Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, n. 3, p. 436-438, 2001.

FÜRST, R. **Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade**. 2002. 46 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol. Reprod.**, v. 34, p. 127-38, 1986. GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet. Clin. North. Am.**, v. 12, p.131-147, 1996. (Equine Practice).

GRAHAM, J. K. Current Techniques for freezing equine semen. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa, 1995-1996. **Proceedings...** Fort Collins-Co, 1996.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VER, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. *et al.* Development of an assay the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fert.**, v. 70, p. 219-228, 1984.

KEITH, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. 1998. 104 f. Thesis (Master of Science) – Colorado State University, Fort Collins, Colorado, 1998.

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

MC LAUGHLIN, E. A.; FORD, W. C. L.; HULL, G. R. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **J. Reprod. Fertility**, v. 95, p. 525-534, 1992.

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1987. v. 2, p.701.

MIES FILHO, A.; SOUZA, I. M. Congelação do sêmen de bode: Efeito de duas soluções de lavagem. **A Hora Veterinária**, Ano 5, n. 29, p. 53-58.

MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold-shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 291-304, 1992

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

PARKS, E. J.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29; p. 255-266, 1992.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **J. Reprod. Fert.**, v. 60, p. 403-407, 1980.

ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without EQUEX STM paste. **Theriogenology**, v. 51, p. 1045-1058, 1999.

SAEG. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas**. Viçosa-MG: UFV, Central de Processamento de Dados, 2005.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F. *et al.* Uso do teste hipoosmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, p. 438-439, 2001.

SILVA, A.F. **Uso da dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de semen caprino**. 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

SMITH, J. F.; MURRAY, G. R. Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. Staining techniques in spermatozoa. **Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.**, v. 57, p. 246-250, 1997.

SOUZA, A. F.; GUERRA M. M. P.; BATISTA, A. M.; MERGULHÃO, F. C. C.; NEVES, A. C.; WISCHRAL, A. Congelação de semen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etileno glicol. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Supl. 5, p. 103-105, 2002.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Principles of cryopreservation. In: **Cooled and frozen Stallion Semen**, b.09, 1999

STROM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, v. 48, p. 1199-1205, 1993.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.) **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p. 189.

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

## EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE EQUÍLÍBRIO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de períodos de equilíbrio sobre as características de motilidade e integridade de membrana de espermatozóides caprinos criopreservados. No total, foram congelados 20 ejaculados de animais da raça Saanen (n = ) e Alpina (n = 2), utilizando-se um meio à base de leite desnatado-gema, acrescido de 5% de glicerol. Alíquotas do sêmen diluído foram, então, resfriadas segundo Furst (2002), e mantidas à temperatura de 5 °C, por um período de 15 minutos (TE1) ou 75 minutos (TE2), antes de serem congeladas em nitrogênio líquido. O sêmen foi avaliado quanto a sua motilidade espermática progressiva, vigor, resposta ao teste hiposmótico (HOST), o teste supravital e ao teste de termorresistência (TTR), antes e após o congelamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste F, a 5% de significância. Não houve diferença entre raças quanto à avaliação das características seminais do sêmen fresco ( $P > 0,05$ ). O TE2 resultou em maior motilidade espermática progressiva, nos tempos de 0 (58 x 49%), 30 minutos (41,3 x 29,3%) e 1 hora (20,3 x 11,3%), avaliada pelo TTR; e em maior taxa de recuperação da motilidade (66,3 x 54,6%), do que o TE1 ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença quanto à motilidade espermática progressiva no tempo de 2 horas do TTR, ao vigor espermático, ao HOST e ao teste supra-vital entre os semens de TE1 e TE2 ( $P > 0,05$ ). As características morfológicas do sêmen descongelado não diferiram entre os diferentes tempos de equilíbrio ( $P > 0,05$ ). Portanto, o tempo de equilíbrio de 75 minutos promoveu melhor criopreservação do sêmen caprino que o tempo de equilíbrio curto, de 15 minutos.

**Palavras-chave:** caprino, criopreservação, sêmen, tempo de equilíbrio.



## EFFECT OF DIFFERENT EQUILIBRATION TIMES ON GOAT SEMEN CRYOPRESERVATION

**ABSTRACT:** The aim of this study was to evaluate the effect of different equilibration times on motility characteristics and plasma membrane integrity of cryopreserved goat spermatozoa. A total of 20 ejaculates from Saanen (n = 2) and Alpine (n = 2) goats were frozen using a standard dry skim milk yolk diluent with 5% glycerol. Aliquots of the extended semen were then cooled using the cooling methodology described by Furst (2002) and remained at the temperature of  $-4^{\circ}\text{C}$  by a period of 15 minutes (TE1) or 75 minutes (TE2). The semen was evaluated by total motility, vigor and the response to hypoosmotic solution test (HOST), live/dead stain and thermo-resistance test (TRT), before and after thaw. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), differences between treatments were analyzed by F test at 5% of significance. There was no difference in the fresh semen characteristics between breeds ( $P > 0.05$ ). The TE2 resulted in the highest total motility evaluated by TTR at zero time (58 x 49%), 30 minutes (41.3 x 29%), 1 (20.3 x 11%); and motility recovery rate (66.3 x 54.6%) than TE1 ( $P < 0.05$ ). No difference ( $P > 0.05$ ) was observed to total motility evaluated by TTR at 120 minutes, vigor, HOST and plasma membrane structural integrity between the treatments ( $P > 0.05$ ) The morphological characteristics were not affected by the equilibration times after semen thaw ( $P > 0.05$ ). In conclusion, the equilibration time of 75 minutes protected cell viability better than the period of 15 minutes during the cryopreservation process, improving the cryosurvival of goat spermatozoa.

**Keywords:** caprine, equilibrium time, cryopreservation, semen.

## 1. INTRODUÇÃO

O sucesso do processo de criopreservação do sêmen envolve a utilização de: um diluente de congelamento ideal, que deve conter uma fonte energética para os espermatozóides; crioprotetores, para minimizar os efeitos do resfriamento, congelamento e aquecimento; antibióticos, a fim de inibir o crescimento bacteriano (MEMON e OTT, 1981); taxas de resfriamento e aquecimento adequadas (GILMORE *et al.*, 2000); e períodos de equilíbrio (WIGGIN e ALMQUIST, 1974; DEKA e RAO, 1986), visando maximizar a habilidade de fertilização, diminuir as perdas na criopreservação e aumentar, assim, o sucesso da inseminação artificial (DUNNER, 1993).

O período de equilíbrio é o tempo no qual o espermatozóide permanece à temperatura de 4 – 5 °C antes do congelamento (WIGGIN e ALMQUIST, 1974). Esse tempo é necessário para que os espermatozóides interajam com os constituintes do meio (gema de ovo e crioprotetores) e adquiram máxima resistência aos danos causados à célula espermática pelo processo de criopreservação (BOUCHARD *et al.*, 1990; ENGLAND, 1993).

Diferentes períodos de equilíbrio são descritos para criopreservação do sêmen caprino (SAHNI e ROY, 1972; WAIDE *et al.*, 1977; DEKA e RAO, 1986), equino (FURST, 2002), bovino (JONDET, 1967; WIGGIN e ALMQUIST, 1974). Segundo Deka e Rao (1986), essa diversidade pode ser devido às diferenças na composição dos meios de congelamento, utilizados nas diferentes espécies. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de dois diferentes períodos de equilíbrio sobre a viabilidade espermática pós-criopreservação, utilizando como meio o leite desnatado-gema, acrescido de 5% de glicerol.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, situado a 20°45'20" latitude S e 42°52'40" W Gr, a uma altitude média de 752 m. O período experimental compreendeu os meses de julho e agosto (período de início do anestro sazonal) de 2005.

Foram utilizados quatro bodes, clinicamente sadios e maduros sexualmente, das raças Pardo Alpino (n=2) e Saanen (n=2). Os animais foram submetidos a exame andrológico prévio, tendo sido analisados os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen. Todos os semens estavam dentro do padrão considerado normal para a espécie (CBRA, 1998).

As coletas foram realizadas com intervalo de dois dias, utilizando como manequim uma fêmea em estro induzido. Foram realizadas cinco coletas por reprodutor, totalizando 20 coletas para o período experimental. Após a coleta, pelo método da vagina artificial, os ejaculados foram encaminhados ao laboratório de processamento e colocados em incubação a 37 °C, em banho-maria, sendo realizado então o exame físico (volume, vigor e motilidade espermática progressiva) e morfológico do sêmen para avaliação das características seminais, segundo CBRA (1998). A integridade funcional e estrutural da membrana plasmática foi avaliada pelo teste hiposmótico (FONSECA *et al.*, 2001) e pelo teste supravital, também conhecido como coloração de vivos/mortos.

Após a avaliação, o sêmen foi diluído em solução de Ringer-Lacato®, na proporção de um volume de sêmen para nove de Ringer, e centrifugado a 600 G, por 10 minutos, para retirada do sobrenadante, ou seja, do plasma seminal. Após a centrifugação e retirada do líquido sobrenadante, o pellet de sêmen foi então rediluído com diluente leite desnatado-gema (MIES FILHO, 1982), acrescido de 5% de glicerol, na proporção de um volume de sêmen para um volume de diluidor. Após a pré-diluição, foi acrescentado o volume de diluidor suficiente para o ajuste da concentração total de espermatozóides de 200 milhões por mL e da dose inseminante de 50 milhões de espermatozóides.

Após a rediluição, o sêmen foi envasado em palhetas de polietileno de 0,25 mL, mantidas à temperatura ambiente, para ambos os procedimentos de criopreservação. O processamento inicial do sêmen, da coleta até que o sêmen fosse submetido ao resfriamento, não excedeu o tempo de 20 minutos. O sêmen foi submetido à curva de resfriamento descrita por Fürst (2002). As palhetas foram alocadas em um tubo de ensaio (15 mL), que foi hermeticamente fechado. Posteriormente, o tubo de ensaio foi colocado no interior de uma mamadeira plástica (240 mL) contendo 120 mL de álcool

absoluto, ambos mantidos à temperatura ambiente (24 °C), e levado ao interior de uma geladeira, à temperatura de 5 °C. Após atingir a temperatura de 5 °C, o sêmen foi mantido em equilíbrio por 15 minutos (TE1) ou 75 (TE2).

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas que estavam em equilíbrio a 5 °C no interior de um botijão de nitrogênio, à altura de 5 cm do nitrogênio, por 15 minutos (BETINI, 1998). Após esse período, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido. Em seguida, as palhetas foram acondicionadas em *canister* apropriado, e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido, até a sua avaliação.

As amostras de sêmen criopreservadas, utilizando os dois diferentes tempos de equilíbrio, foram avaliadas após a coleta e o descongelamento, realizado em banho-maria a 37 °C, por 30 segundos. A motilidade e o vigor, a característica morfológica e a integridade estrutural (teste supravital) e funcional (HOST) foram avaliados segundo a metodologia descrita no experimento 1. A taxa de recuperação da motilidade (TRMot) foi avaliada pela divisão entre a motilidade espermática progressiva do sêmen descongelado e a motilidade espermática progressiva do sêmen a fresco, multiplicando-se o resultado por 100 (ABOAGLA e TEREDA, 2003)

A longevidade dos espermatozóides foi avaliada em todas as amostras de sêmen descongeladas pelo teste de termorresistência (TTR), que consistiu em colocar uma amostra de sêmen de 0,2 mL em um frasco de *ependorf* de 1,5 mL, que foi incubado em banho-maria a 37 °C, por um período de 120 minutos. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados pelo TTR nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos.

Os dados obtidos para as características estudadas foram submetidos aos testes de normalidade (teste de LILLIEFORS) e homocedasticidade (teste de COCHRAN). Posteriormente, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste F, a 5% de probabilidade de erro. A variável vigor espermático foi submetida ao teste não-paramétrico de Wilcox, para comparação das médias dos tratamentos. Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico SAEG 9.0.

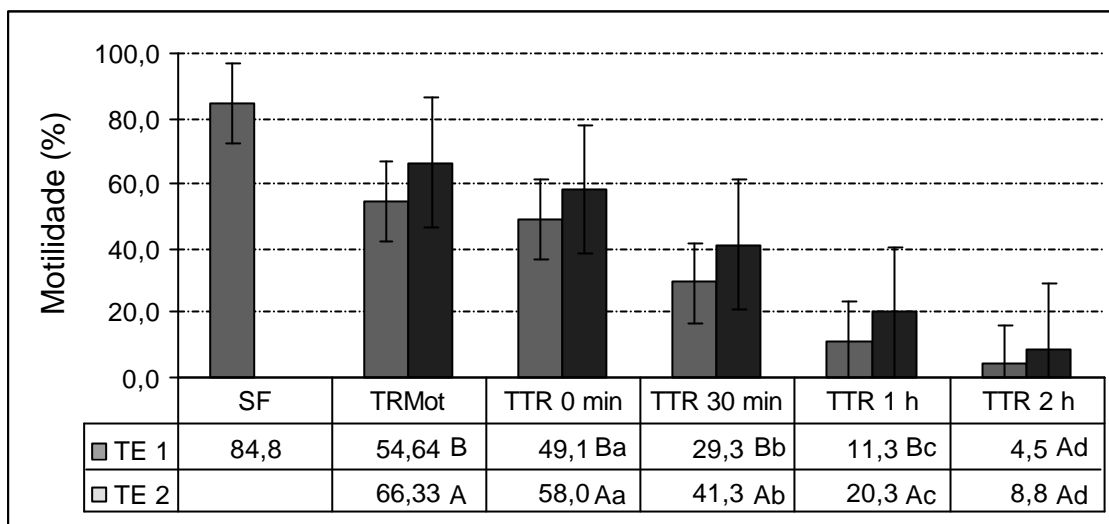
### 3. RESULTADOS

As características seminais do sêmen fresco dos reprodutores utilizados neste experimento, observadas na Tabela 1, estavam condizentes com os parâmetros considerados normais para a espécie caprina (BETINI *et al.*, 1998; AZERÊDO *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2001). Constatou-se, também, que os semens foram considerados aptos para serem criopreservados (CBRA, 1998).

Tabela 1 – Características seminais de bodes das raças Pardo Alpino e Saanen, doadores de sêmen para experimentação em criopreservação espermática

Características Seminais	Animais			
	Raça Pardo Alpino		Raça Saanen	
	Bode 01	Bode 02	Bode 03	Bode 04
<b>FÍSICAS</b>				
Volume (mL)	0,6 ± 0,24	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Motilidade (%)	86,0 ± 4,1	82,0 ± 7,5	86,0 ± 4,1	86,0 ± 4,1
Vigor (0-5)	4 ± 0,8	3,5	3,8 ± 0,6	3,8 ± 0,8
Concentração (x10 <sup>7</sup> eptz/mL)	2,2 ± 0,7	2,1 ± 0,5	2,0 ± 0,4	2,1 ± 1,1
<b>MORFOLÓGICAS</b>				
Defeitos Totais (%)	0,8 ± 1,7	2,6 ± 1,6	4,0 ± 1,3	2,2 ± 1,3
<b>INTEGRIDADE DE MEMBRANA</b>				
HOST (%)	69,4 ± 12,2	67,6 ± 11,7	55,4 ± 12,2	61,4 ± 9,8
Vivos/mortos (%)	92,6 ± 02,8	88,8 ± 7,8	89,8 ± 4,3	89,0 ± 7,4

Após o descongelamento, a motilidade espermática total, avaliada pelo TTR no tempo zero (58 x 49,1%), 30 (41,3 x 29,3%) e 60 minutos (20,3 x 11,3%), e a taxa de recuperação da motilidade (66,3 x 54,6%) foram maiores nas amostras de sêmen congeladas após o tempo de equilíbrio de 75 minutos, quando comparada com a motilidade das amostras com tempo de equilíbrio de somente 15 minutos ( $P < 0,05$ ; Figura 1). No entanto, não houve diferença entre os tratamentos quanto à motilidade espermática total avaliada pelo TTR no tempo de 120 minutos (8,8 x 4,5%), para TE 1 e 2, respectivamente ( $P > 0,05$ ). A



<sup>A,B</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste F.  
<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste F.

Figura 1 – Valores médios (%) e desvios-padrão da motilidade espermática progressiva para o sêmen fresco (SF) e para o teste de termorresistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação, e da taxa de recuperação de motilidade (TRMot) do sêmen caprino criopreservado, utilizando-se o tempo de equilíbrio de 15 (TE 1) ou 75 minutos (TE 2).

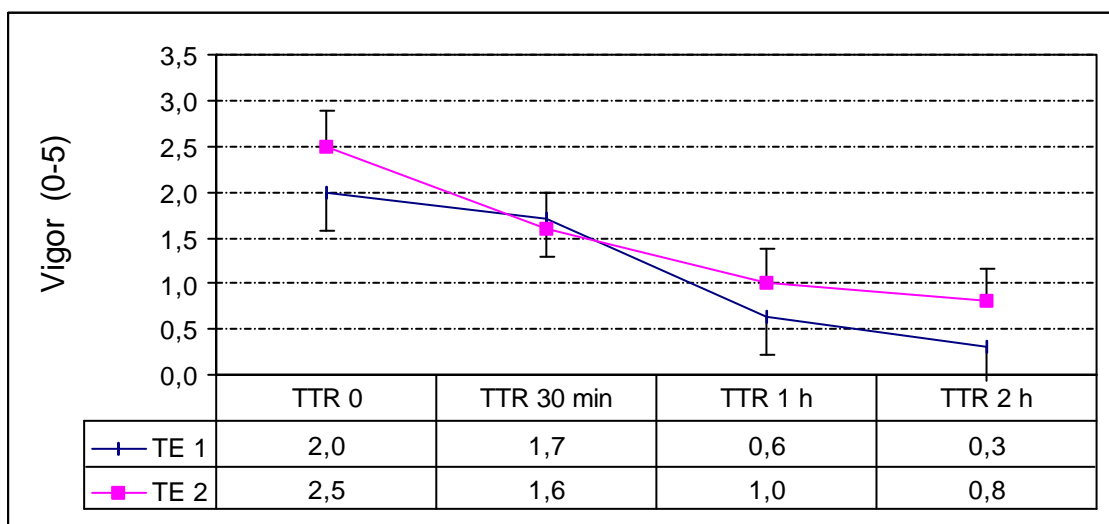
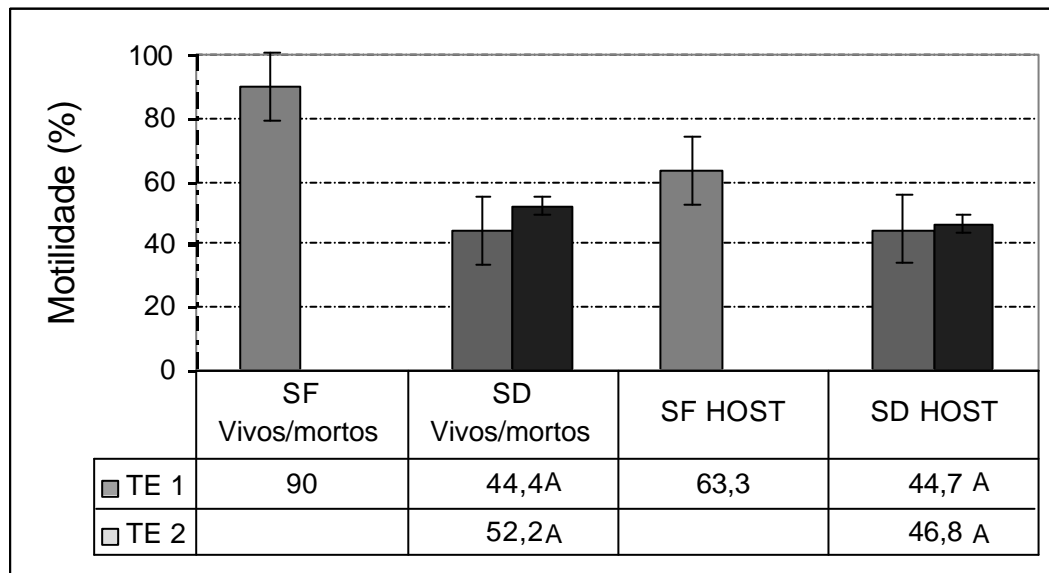


Figura 2 – Valores médios e desvios-padrão do vigor espermático, durante o teste de termorresistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação, utilizando-se o tempo de equilíbrio de 15 (TE 1) ou 75 minutos (TE 2). Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no vigor espermático entre os protocolos de resfriamento avaliados pelo teste F.

motilidade espermática progressiva avaliada nos diferentes tempos do TTR, dentro de cada tempo de equilíbrio, diminuiu em função do tempo de avaliação pelo TTR ( $P < 0,05$ ).

O vigor espermático não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os diferentes períodos de resfriamento, dentro de cada tempo de avaliação do TTR (Figura 2). Entretanto, o vigor espermático diminuiu em função do TTR, para ambos os períodos de equilíbrio.

A porcentagem de espermatozóides vivos, avaliada pela teste supravital (52,2 x 44,4%), e a reatividade da membrana da cauda do espermatozóide ao HOST (46,8 x 44,7%) não diferiram entre o sêmen criopreservado, utilizando os períodos de equilíbrios de 75 e de 15 minutos, respectivamente (Figura 3;  $P > 0,05$ ).



<sup>A,B</sup> Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste F.

Figura 3 – Valores médios (%) e desvios-padrão do sêmen fresco (SF) e descongelado (SD) de espermatozóides vivos e com membrana plasmática da cauda funcional, avaliados pelo teste supravital e pelo teste hiposmótico (HOST), respectivamente, do sêmen caprino criopreservado, utilizando-se o tempo de equilíbrio de 15 (TE 1) ou 75 minutos (TE 2).

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os tempos de equilíbrio, quanto às características morfológicas do sêmen, após o processo de criopreservação (Tabela 2). No entanto, a porcentagem de defeitos totais aumentou para ambos os tempos de equilíbrio após o descongelamento. Este aumento foi devido, principalmente, ao aumento na porcentagem de lesões no acrossoma das células espermáticas.

Tabela 2 – Valores médios e desvios-padrão de defeitos de acrossoma e defeitos espermáticos totais do sêmen de bodes das raças Pardo Alpina e Saanen submetido à criopreservação, utilizando-se o tempo de equilíbrio de 15 (TE 1) ou 75 minutos (TE 2)

Características Morfológicas (%)	Método de Resfriamento	
	PR1	PR2
Acrossoma	7,3 ± 4,2	6,2 ± 3,8
Total defeitos	12,4 ± 4,5	10,8 ± 4,5

\* Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste F.

#### 4. DISCUSSÃO

A motilidade espermática progressiva, o vigor espermático e a taxa de recuperação da motilidade pós-descongelamento encontrados neste estudo, para as diferentes metodologias, estão de acordo com os padrões preconizados para utilização de sêmen criopreservado pelo CBRA (1998) e, ou, dentro dos valores médios encontrados para o sêmen caprino (BARBOSA, 1999; FERRARI e BARNABE, 1999; AZEREDO *et al.*, 2001; SANTOS, 2001; ABOAGLA e TERADA, 2003; SILVA, 2004; BITTENCOURT *et al.*, 2004).

O uso de um período de equilíbrio de 75 minutos melhorou a taxa de recuperação espermática, a motilidade espermática progressiva e a longevidade do sêmen caprino descongelado, quando comparado ao tempo de equilíbrio de 15 minutos. No entanto, não afetou o vigor espermático e a integridade funcional e estrutural da membrana plasmática. Deka e Rao (1986) relatam o aumento na motilidade espermática progressiva com o aumento no tempo de equilíbrio de 1 até 5 horas, o que está de acordo com os resultados descritos



por Frazer (1962). No entanto, DEKA e RAO (1986) relataram aumento na porcentagem de espermatozoides com danos no acrossoma, comprometendo a capacidade fertilizante do espermatozoide, quando o período de equilíbrio excede 1 hora. Portanto, parece haver um paradoxo entre tempo de equilíbrio e viabilidade da célula espermática, principalmente quando o glicerol é utilizado em concentração superior a 6% (v/v).

No presente estudo os diferentes períodos de equilíbrio não diferiram ( $P > 0,05$ ) quanto à porcentagem de defeitos morfológicos do sêmen descongelado, visto que o tempo de equilíbrio não excedeu 75 minutos. Entretanto, houve aumento na porcentagem de danos ao acrossoma, em função dos danos celulares causados pelo processo de criopreservação.

## 5. CONCLUSÃO

O uso de tempo de equilíbrio de 75 minutos melhora a viabilidade celular espermática caprina no pós-descongelamento, quando comparado ao tempo de equilíbrio de 15 minutos, e utilizando o diluente leite desnatado-gema, acrescido de 5% de glicerol.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOAGLA, E. M. E.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, n. 69, p. 1245-1250, 2003.

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

BARBOSA, L. P. **Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de semen, em programas de inseminação artificial em caprinos da raça Alpina**. 1999. 71 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

BETINI, C. M.; MORAES, G. V.; RIGOLON, C. R. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. **Acta Scientiae**, v. 20, n. 3, p. 361-365, 1998.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; FÜRST, R.; TEIXEIRA, R. B. S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A. P.; ALVES, S. G. G.; ALMEIDA, A. K.; GUIMARAES, J. D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação de sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.

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

COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. **J. Reprod Fert.**, v. 42, p. 277-285, 1975.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. Ed. Belo Horizonte, 1998. p. 25-27.

DEKA, B. C.; RAO, A. R. Effect of glycerol level in Tris based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. **Theriogenology**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 1986.

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

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v. 47, p. 243-255, 1993.

FERRERI, S.; BARNABE, V. H. Efeito de diferentes diluidores e métodos de congelação na qualidade do sêmen criopreservado de caprinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 36, n. 4, 1999.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F. *et al.* Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, n. 3, p. 436-438, 2001

FRASER, A. F. A technique for goat semen and results of a small breeding trial. **Canad. Vet. J.**, v. 3, p. 133-144.

FÜRST, R. **Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade**. 2002. 46 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

GILMORE, J. A.; LIU, J.; WOODS, E. J.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 335-342, 2000.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinária**, v. 10, p. 156-165, 1994.

JONDET, R. Influence du temps d'équilibration sur la congélation et le pouvoir fécondant du sperme taureau. **C. R. acad. Agr. Fr.** v. 53, p. 1407, 1967.

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

MIES FILHO, A **Reprodução dos animal e inseminação artificial**. 5. Ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. v.2.

SAEG – SISTEMA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS E GENÉTICAS. Universidade Federal de Viçosa - UFV, Central de processamento de dados, Viçosa - MG, 2005.

SAHNI, K.L.; ROY, A. A stud on the effect of deep freezing (-79°C) on post thawing revival of sheep and goat spermatozoa. **Indian J. Anim. Sci.**, v. 42, p. 102-105, 1972.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F. *et al.* Uso do teste hipoosmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, p. 438-439, 2001

SILVA, A. F. **Uso da dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de semen caprino**. 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

WAIDE, Y.; NIWA, T.; ASANUMA, R. Studies on preservation of liquid and frozen semen of domestic animals. 3. Viability and fertility of frozen goat semen. **Japanese J. Anim. Reprod.**, v. 23, p. 129-137, 1977.

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

WIGGIN, H.B.; ALMQUIST, J. O. Combinations of glycerol percent, glycerol equilibrium time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. **J. Dairy Sci.**, v. 58, n. 3, p. 416-419, 1974.

## EFEITO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES PERMEÁVEIS SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do glicerol e etileno glicol sobre a criopreservação de sêmen caprino, por meio de análises *in vitro* do sêmen. No total, foram congelados 20 ejaculados de animais da raça Saanen (n = 2) e Alpina (n = 2), utilizando-se um meio à base de leite desnatado-gema, acrescido de 5% de glicerol. Alíquotas do sêmen diluído foram então resfriadas, utilizando-se a metodologia descrita por Fürst (2002). O sêmen foi avaliado quanto a sua motilidade espermática progressiva, vigor, resposta ao teste hiposmótico (HOST), o teste supravital e ao teste de termorresistência (TTR), antes e após o congelamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste F, a 5% de significância. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as raças na avaliação das características seminais do sêmen fresco. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) quanto à motilidade espermática progressiva, avaliada pelo TTR nos tempos zero (53,3 x 56,6%), 30 (38,8 x 47,7%), 60 (23 x 30%) e 120 minutos (11,5 x 13,5%); à taxa de recuperação da motilidade (62,2 x 66,2%); e à integridade estrutural da membrana (49,7 x 53,6%), nas amostras de sêmen criopreservadas, utilizando como crioprotetores o glicerol e o EG, respectivamente. O EG promoveu melhor ( $P < 0,05$ ) resposta ao HOST que o glicerol (52 e 43,6%, respectivamente) do sêmen descongelado. As características morfológicas não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os crioprotetores, no sêmen descongelado. Concluindo, o uso do EG como crioprotetor permeável promoveu a melhor proteção à viabilidade da célula espermática, durante o processo de criopreservação, do que o glicerol.

**Palavras-chave:** caprino, criopreservação, etileno-glicol, glicerol, sêmen.

## EFFECT OF DIFFERENT PERMEATING CRYOPROTECTANTS ON GOAT SEMEN CRYOPRESERVATION

**ABSTRACT:** The aim of this study was to evaluate the effect of the glycerol (G) and ethylene glycol (EG), on motility characteristics of cryopreserved goat spermatozoa by the *in vitro* semen analyses. A total of 20 ejaculates from Saanen (n = 2) and Alpine (n = 2) goats were frozen using a standard dry skim milk-yolk diluent with 5% glycerol. Aliquots of the extended semen were then cooled using the cooling methodology described by Fürst (2002). The semen was evaluated by total motility, vigor and the response to hypoosmotic solution test (HOST), live/dead stain and thermo-resistance test (TRT), before and after thaw. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), differences between treatments were analyzed by F's test at 5% of significance. There was no difference in the fresh semen characteristics between breeds ( $P > 0.05$ ). The total motility evaluated by TTR at time zero (53.3 x 56.6%), 30 minutes (38.8 x 47.7%), 1 (23 x 30%) and 2 hours (11.5 x 13.5%); the motility recovery rate (62.2 x 66.2%); and the plasma membrane structural integrity (49.7 x 53.6%) did not differ between the cryopreserved semen using the EG and G, respectively ( $P > 0.05$ ). The EG had a better ( $P < 0.05$ ) hypoosmotic reaction (HOST) than Glycerol after thaw (52 x 43.6%, respectively). The morphological characteristics did not differ between the cryoprotectants after thaw ( $P > 0.05$ ). In conclusion, EG promoted a better protection of the spermatic cell viability during the cryopreservation than the G.

**Keywords** caprine, cryopreservation, glycerol, ethylene glycol, semen.

## 1. INTRODUÇÃO

Os danos causados às células durante o processo de criopreservação ocorrem, principalmente, devido à formação de gelo intracelular, durante taxas de congelamento rápidas, e ao efeito solução, que ocorre durante taxas de congelamento lentas. Crioprotetores são agentes químicos que são adicionados aos diluentes de congelamento, para minimizar o efeito desses dois tipos de danos.

Crioprotetores capazes de atravessar a membrana plasmática do espermatozóide são classificados como permeáveis. Estes atuam no meio intra e extracelular, e incluem moléculas como: o glicerol, o etilenoglicol (EG), o dimetilsulfóxido (DMSO), o 1,2 propanodiol e amidas (MCKINNON, 1996). A estrutura molecular dos diferentes crioprotetores determina sua eficiência, visto que a sua afinidade pela água, pela presença de grupamentos amina e hidroxila em sua composição, favorece a formação de ligações com as moléculas de água (BAUDOT *et al.*, 2002). Essas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial às células (DALIMATA, 1997).

O glicerol (Gli) foi o primeiro crioprotetor utilizado no congelamento de sêmen, e até hoje é o mais utilizado no congelamento de sêmen caprino (BARBOSA, 1999; LEBOUF *et al.*, 2000). O mecanismo exato pelo qual o glicerol protege as células dos danos de congelamento e descongelamento não é completamente entendido. Amann e Pickett (1987) sugerem que o maior efeito benéfico do glicerol é extracelular, diminuindo os danos causados pelo efeito de solução sobre a célula. Contudo, o glicerol também confere proteção interna à membrana celular (PARKS e GRAHAM, 1992), reduzindo o número de poros e funções ATP-dependente e promovendo, assim, a agregação protéica e a formação de blocos de lipídeos. Apesar dos seus efeitos essenciais ao processo de criopreservação celular, o glicerol pode também produzir efeitos adversos nos espermatozóides, por apresentar graus de toxicidade dependentes da concentração utilizada (PARKS e GRAHAM, 1992).

O etileno glicol (EG) é um agente crioprotetor do grupo dos álcoois, que atualmente vem sendo utilizado no congelamento de sêmen, em substituição ao glicerol em caprinos (SOUZA *et al.*, 2002; BITTENCOURT *et al.*, 2004),

eqüinos (MERCANTE *et al.*, 1995; ALVARENGA *et al.*, 2000) e ovinos (MORAES *et al.*, 1995). O EG possui menor peso molecular e toxicidade do que o glicerol, e essas características, associadas à sua alta permeabilidade celular, fazem do EG o crioprotetor adequado para os processos de congelamento e vitrificação de embriões (MASSIP, 2001) e espermatozóides humanos (GILMORE *et al.*, 2000).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de dois diferentes crioprotetores, glicerol e etileno glicol, sobre a criopreservação de sêmen caprino, por meio de análises *in vitro* do sêmen.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, situado a 20°45'20" latitude S e 42°52'40" W Gr, a uma altitude média de 752 m. O período experimental compreendeu os meses de julho e agosto (período de início do anestro sazonal) de 2005

Foram utilizados quatro bodes, clinicamente sadios e maduros sexualmente, das raças Pardo Alpino (n=2) e Saanen (n=2). Os animais foram submetidos a exame andrológico prévio, sendo analisados os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen. Todos os semens estavam dentro do padrão considerado normal para a espécie (CBRA, 1998).

As coletas foram realizadas com intervalo de dois dias, utilizando como manequim uma fêmea em estro induzido. Foram realizadas cinco coletas por reprodutor, totalizando 20 coletas para o período experimental. Após a coleta, pelo método da vagina artificial, os ejaculados foram encaminhados ao laboratório de processamento e colocados em incubação a 37 °C, em banho-maria, sendo realizados então os exames físico (volume, vigor e motilidade espermática progressiva) e morfológico do sêmen para avaliação das características seminais, segundo CBRA (1998). A integridade funcional e estrutural da membrana plasmática foi avaliada pelo teste hipoosmótico (FONSECA *et al.*, 2001) e pelo teste supravital, também conhecido como coloração de vivos/mortos.

Após a avaliação, o sêmen foi diluído em solução de Ringer-Lacato®, na proporção de um volume de sêmen para nove de Ringer, e centrifugado a 600 G, por 10 minutos, para retirada do sobrenadante, ou seja, do plasma seminal. Após a centrifugação e retirada do líquido sobrenadante, o pellet de sêmen foi então rediluído com diluente leite de desnatado-gema (MIES FILHO, 1982), acrescido de 5% de glicerol ou etileno glicol (EG), na proporção de um volume de sêmen para um volume de diluidor. Após a pré-diluição, foi acrescentado o volume de diluidor suficiente para o ajuste da concentração total de espermatozoides de 200 milhões por mL, e dose inseminante de 50 milhões de espermatozoides.

Após a rediluição, o sêmen foi envasado em palhetas de polietileno de 0,25 mL, mantidas à temperatura ambiente, para ambos os procedimentos de criopreservação. O processamento inicial do sêmen, da coleta até que ele fosse submetido ao resfriamento, não excedeu o tempo de 20 minutos. O sêmen foi submetido à curva de resfriamento descrita por Furst (2002). As palhetas foram alocadas em um tubo de ensaio (15 mL), que foi hermeticamente fechado. Posteriormente, o tubo de ensaio foi colocado no interior de uma mamadeira plástica (240 mL) contendo 120 mL de álcool absoluto, ambos mantidos à temperatura ambiente (24°C), e levado ao interior de uma geladeira, à temperatura de 5°C. Após atingir a temperatura de 5°C, o sêmen foi mantido em equilíbrio por 75 minutos.

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas que estavam em equilíbrio a 5 °C no interior do um botijão de nitrogênio, à altura de 5 cm do nitrogênio, por 15 minutos (BETINI, 1998). Após esse período, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido. Em seguida, as palhetas foram acondicionadas em *canister* apropriado, e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido, até a sua avaliação.

As amostras de sêmen criopreservadas, utilizando os dois diferentes tempos de equilíbrio, foram avaliadas após a coleta e o descongelamento, realizado em banho-maria a 37 °C, por 30 segundos. A motilidade e o vigor, a característica morfológica e a integridade estrutural (teste supravital) e funcional (HOST) foram avaliados segundo a metodologia descrita no experimento 1. A taxa de recuperação da motilidade (TRMot) foi avaliada pela



divisão entre a motilidade espermática progressiva do sêmen descongelado e a motilidade espermática progressiva do sêmen a fresco, multiplicando-se o resultado por 100 (ABOAGLA e TEREDA, 2003)

A longevidade dos espermatozóides foi avaliada em todas as amostras de sêmen descongeladas pelo teste de termorresistência (TTR), que consistiu em colocar uma amostra de sêmen de 0,2 mL em um frasco de *ependorf* de 1,5 mL, que foi incubado em banho-maria 37 °C, por um período de 120 minutos. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados pelo TTR, nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos.

Os dados obtidos para as características estudadas foram submetidos aos testes de normalidade (teste de LILLIEFORS) e homocedasticidade (teste de COCHRAN). Posteriormente, foram submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste F, a 5% de probabilidade de erro. A variável vigor espermático foi submetida ao teste não-paramétrico de Wilcox, para comparação das médias dos tratamentos. As análises foram todas realizadas por meio do programa estatístico SAEG 9.0.

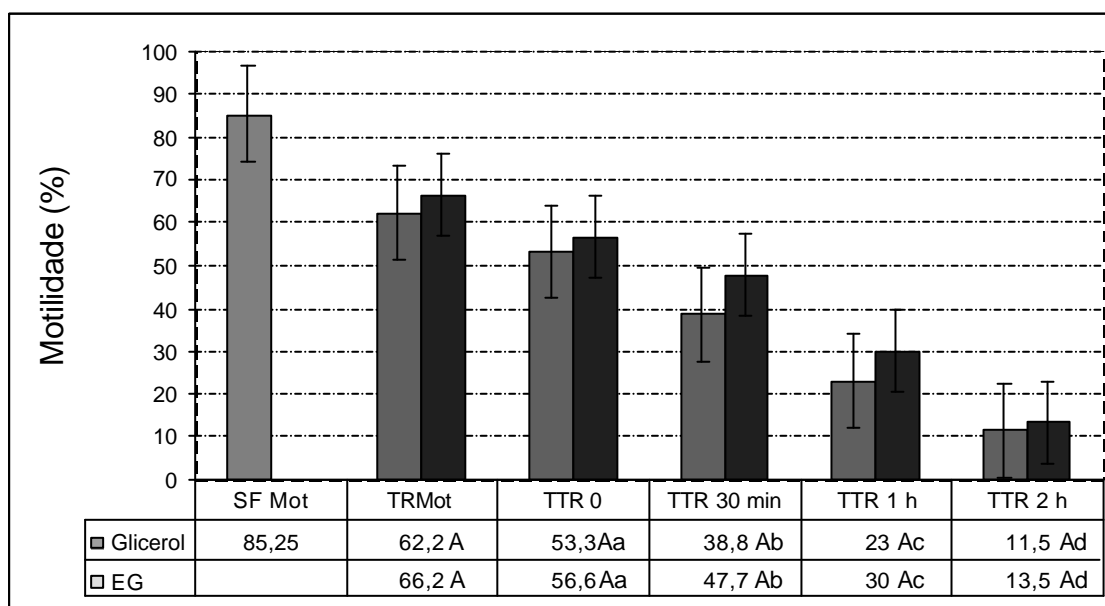
### 3. RESULTADOS

As características seminais do sêmen fresco dos reprodutores utilizados neste experimento, observadas na Tabela 1, estavam condizentes com os parâmetros considerados normais para a espécie caprina (BETINI *et al.*, 1998; AZERÊDO *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2001). Os semens foram considerados aptos para serem criopreservados (CBRA, 1998).

Após o descongelamento, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) nos tratamentos quanto à motilidade espermática total, avaliada pelo TTR no tempo zero (53,3 e 56,6%), 30 (38,8 e 47,7%), 60 (23 e 30%) e 120 minutos (11,5 e 13,5%) e a taxa de recuperação da motilidade (62,2 e 66,2%) nas amostras de sêmen criopreservadas, utilizando-se o glicerol ou o EG, respectivamente (Figura 1). A motilidade espermática progressiva avaliada nos diferentes tempos do TTR, dentro de tratamento, diminuiu ( $P < 0,05$ ) em função do tempo.

Tabela 1 – Características seminais de bodes das raças Pardo Alpina e Saanen, doadores de sêmen para experimentação em criopreservação espermática

Características Seminais	Animais			
	Raça Pardo Alpino		Raça Saanen	
	Bode 01	Bode 02	Bode 03	Bode 04
<b>FÍSICAS</b>				
Volume (mL)	0,66 ± 0,24	1,14 ± 0,21	0,70 ± 0,23	1,30 ± 0,27
Motilidade (%)	86,0 ± 4,1	82,0 ± 7,5	86,0 ± 4,1	86,0 ± 4,1
Vigor (0-5)	4 ± 0,8	3,5	3,8 ± 0,6	3,8 ± 0,8
Concentração (x10 <sup>7</sup> eptz/mL)	2,21 ± 0,74	2,13 ± 0,52	2,00 ± 0,40	2,13 ± 1,15
<b>MORFOLÓGICAS</b>				
Defeitos Totais (%)	0,8 ± 1,7	2,6 ± 1,6	4,0 ± 1,3	2,2 ± 1,3
<b>INTEGRIDADE DE MEMBRANA</b>				
HOST (%)	69,4 ± 12,2	67,6 ± 11,7	55,4 ± 12,2	61,4 ± 09,8
Vivos/mortos (%)	92,6 ± 02,8	88,8 ± 07,8	89,8 ± 04,3	89,0 ± 07,4



<sup>A,B</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste F.

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste F.

Figura 1 – Valores médios (%) e desvios-padrão da motilidade espermática progressiva para o sêmen fresco (SF) e para o teste de termorresistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação, e da taxa de recuperação de motilidade (TRMot) do sêmen caprino criopreservado, utilizando-se o glicerol e o etileno glicol (EG) como crioprotetores.

O vigor espermático não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação do TTR (Figura 2). Entretanto, o vigor espermático diminuiu em função do tempo de avaliação durante o TTR, para ambos os crioprotetores. A porcentagem de espermatozóides vivos, avaliada pelo teste supravital, não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre o sêmen criopreservado utilizando o glicerol (49,7%) e o EG (53,6%) (Figura 3). A reação da membrana da cauda do espermatozóide ao HOST foi maior ( $P < 0,05$ ) para o EG (52%) do que para o glicerol (43,6%).

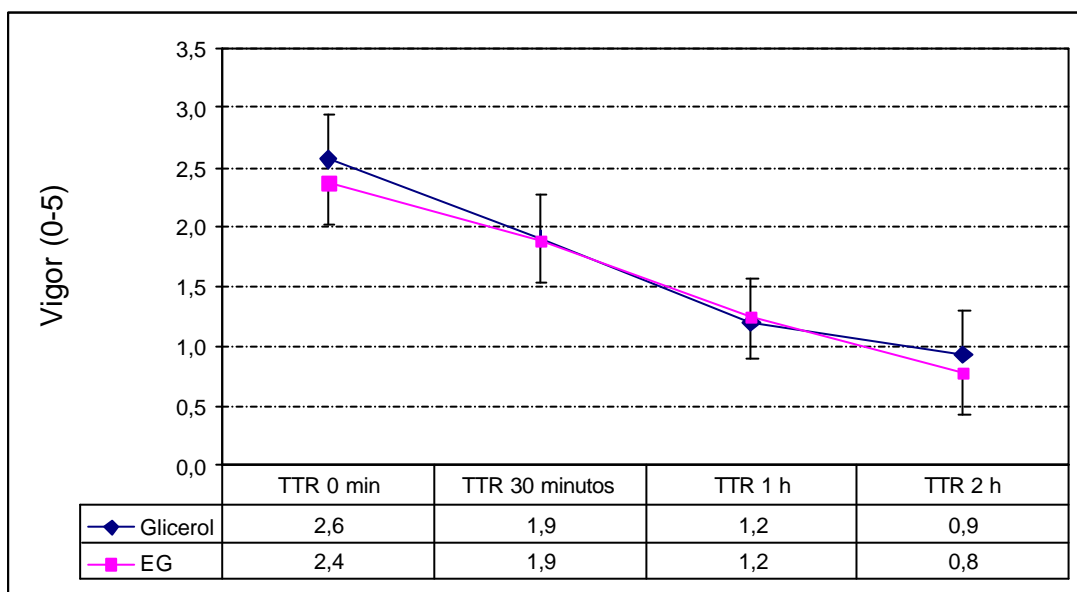
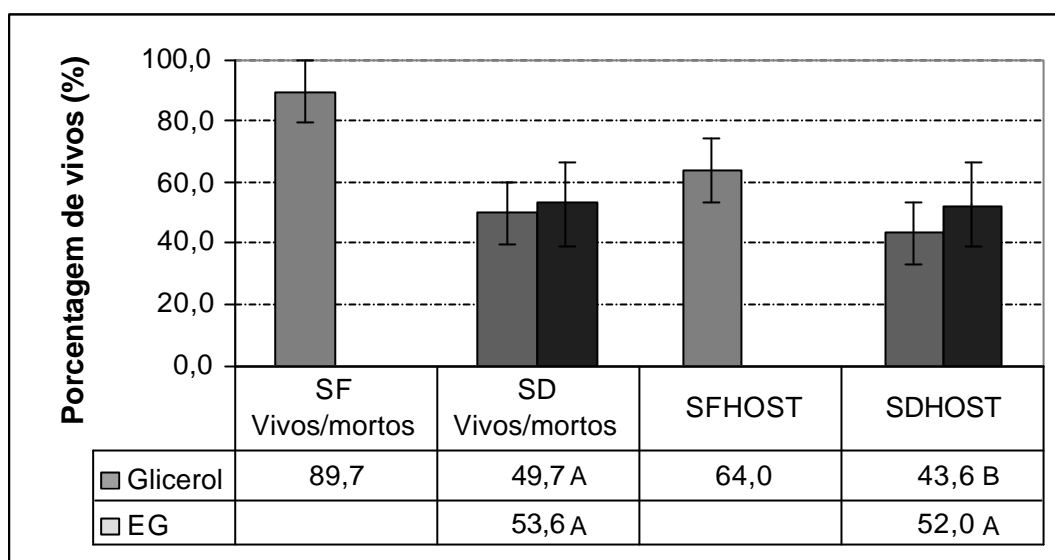


Figura 2 – Valores médios e desvios-padrão do vigor espermático durante o teste de termorresistência (TTR), nos diferentes tempos de avaliação do sêmen caprino congelado, utilizando-se o glicerol e o etileno glicol (EG) como crioprotetores. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no vigor espermático entre os protocolos de resfriamento avaliados pelo teste F.

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos quanto às características morfológicas do sêmen após o processo de criopreservação (Tabela 2). No entanto, a porcentagem de defeitos totais aumentou em ambas as metodologias de resfriamento, após a criopreservação. Esse aumento foi devido, principalmente, ao aumento na porcentagem de lesões no acrossoma dos espermatozóides.



<sup>A,B</sup> Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste F.

Figura 3 – Valores médios (%) e desvios-padrão do sêmen fresco (SF) e descongelado (SD) de espermatozóides vivos e com membrana plasmática da cauda funcional, avaliados pelo teste supravital e pelo teste hiposmótico (HOST), respectivamente, do sêmen caprino criopreservado utilizando-se o glicerol ou o etileno glicol (EG) como crioprotetores.

Tabela 2 – Valores médios e desvios-padrão de defeitos de acrossoma e defeitos espermáticos totais do sêmen de bodes das raças Pardo Alpina e Saanen submetido à criopreservação, utilizando-se o glicerol e o etileno glicol (EG) como crioprotetores

Características Morfológicas (%)	Método de Resfriamento	
	PR1	PR2
Acrossoma	6,2 ± 3,7	6,9 ± 2,6
Total defeitos	10,8 ± 4,5	10,4 ± 4,6

\* Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos, pelo teste F.

#### 4. DISCUSSÃO

Os crioprotetores utilizados neste experimento, glicerol e etileno glicol (EG), protegem as células por meio de suas propriedades coligativas de manter a concentração da solução celular interna e externa em níveis não-danosos

(CRITSER *et al.*, 1988). Contudo, a presença do crioprotetor (CP) pode causar danos à célula, e o CP que pode proteger uma célula pode não ser o apropriado para outra (POLGE, 1956).

O crioprotetor ideal para criopreservação de espermatozóides humanos é aquele que possui elevada permeabilidade à membrana plasmática, minimizando, dessa forma, os danos causados pela alteração no volume celular; e possui baixa energia de ativação e toxicidade a célula (GILMORE *et al.*, 1997). O presente estudo avaliou o uso do glicerol e EG na criopreservação de espermatozóides caprinos. Os valores de motilidade espermática progressiva e vigor espermático encontrados neste experimento estão de acordo com as normas para aprovação do sêmen para uso do sêmen criopreservado (CBRA, 1998).

As características físicas, morfológicas e de integridade de membrana do sêmen descongelado não diferiram entre os crioprotetores. A taxa de recuperação, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático pós-descongelamento encontrados neste estudo, para as diferentes metodologias, estão de acordo com as exigências para utilização de sêmen criopreservado do CBRA (1998) e, ou, dentro dos valores médios encontrados na literatura para sêmen caprino (BARBOSA, 1999; FERRARI e BARNABE, 1999; AZEREDO *et al.*, 2001; SANTOS, 2001; ABOAGLA e TERADA, 2003; BITTENCOURT *et al.*, 2004; SILVA, 2004).

O EG promoveu melhor proteção à integridade funcional da membrana do que o glicerol, diferentemente de outros estudos (SOUZA *et al.*, 2002; BITTENCOURT *et al.*, 2004). O processo de criopreservação reduziu em 18 (EG) e em 31% (glicerol) a integridade de membrana após o descongelamento, quando comparada com a viabilidade a fresco. O valor encontrado para o HOST no meio contendo glicerol está de acordo com os observados por outros autores (SANTOS, 2001; BITTENCOURT, 2004; SILVA, 2004), mas o valor do EG encontra-se abaixo. Bittencourt *et al.* (2004) avaliaram o efeito da substituição do glicerol pelo EG, ambos a 7%, na criopreservação do sêmen caprino, e observaram melhor viabilidade da célula congelada com o glicerol.

Gilmore *et al.* (1995, 2000) avaliaram o efeito de diferentes agentes crioprotetores e da temperatura sobre a permeabilidade da membrana espermática de espermatozóides humanos, e observaram que dentro dos

agentes crioprotetores permeáveis: a energia de ativação (kcal/mol) necessária para o transporte de água através da membrana, na presença dos agentes crioprotetores no diluente, foi menor para o EG (7,8) que para o DMSO (22,2), o glicerol (11,9) e o propileno glicol (15,8); a permeabilidade da membrana do EG é maior do que a do DMSO (10x) e maior que a do glicerol (3x); e que a redução na temperatura diminui a permeabilidade de membrana à água e aos crioprotetores.

O EG é o crioprotetor ideal para ser utilizado na criopreservação de espermatozoides humanos (GILMORE *et al.*, 1997), por possuir maior permeabilidade na membrana e menor energia de ativação, permitindo maior grau de desidratação da célula, sem maior alteração no volume celular. Estes estudos podem justificar a melhor viabilidade do sêmen caprino criopreservado, se utilizado o EG como crioprotetor. No entanto, devido às características peculiares a cada espécie animal nos constituintes da membrana plasmática espermática, os valores de permeabilidade da membrana e energia de ativação, assim como o efeito da temperatura sobre esses, podem variar, fazendo necessários estudos específicos na espécie caprina.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados das análises *in vitro* demonstraram que o EG pode ser utilizado como crioprotetor permeável em substituição ao glicerol, quando na concentração de 5%, e preserva melhor a integridade funcional da membrana plasmática que o glicerol.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOAGLA, E.M.E.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, n. 69, p. 1245-1250, 2003.

ALVARENGA, M. A.; GRAHAM, J. K.; KEITH, S. L.; LANDIM ALVARENGA, F. C.; SQUIRES, E.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., Stockolm, 2000. **Proceedings...** Stockolm, 2000. p. 157.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Sci.**, v. 7, p. 145-173, 1987.

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

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

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

BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M. L.; FAUSTO, R. Thermal study of simple aminoalcohol solution. **Cryobiology**, v. 44, p. 150-160, 2002.

BETINI, C. M.; MORAES, G. V.; RIGOLON, C. R. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. **Acta Scientiae**, v. 20, n. 3, p. 361-365, 1998.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R. B. S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A. P.; ALVES, S. G. G.; ALMEIDA, A. K.; GUIMARAES, J. D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação de sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. Ed. Belo Horizonte, 1998. p. 25-27.

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

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

FERRERI, S.; BARNABE, V. H. Efeito de diferentes diluidores e métodos de congelação na qualidade do sêmen criopreservado de caprinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 36, n. 4, 1999.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F. *et al.* Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, n. 3, p. 436-438, 2001.

FÜRST, R. **Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade.** 2002. 46 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

GAO, D. Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L. E.; WATSON, P. F.; KLEINHANS F. W.; MAZUR, P.; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**, v. 10; p. 1109-1122, 1995.

GILMORE, J. A.; LIU, J.; GAO, D. Y.; CRITSER, J. K. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 12, p. 112-118, 1997.

GILMORE, J. A.; LIU, J.; WOODS, E. J.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 335-342, 2000.

GILMORE, J. A.; MCGANN, L. E.; LIU, J.; GAO, D. Y.; TETER, A. Y.; KLEINHANS, F. W.; CRITSER, J. K. Effect of cryoprotectants solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 985-995, 1995.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VER, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. *et al.* Development of an assay the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fert.**, v. 70, p. 219-228, 1984.

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

MASSIP A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reprod. Dom. Ani.**, v. 36, p. 49-55. 2001.

McKINNON, A. O.; WALKER, J. B. Effect of ambient temperature and container on temperature of extended equine semen. **World Equine Veterinary Review**, v. 3, n. 1, p. 5-11, 1998.

MÉNDEZ, J. V.; HERRERA, G. G.; GARCÍA, M. E. G.; GONZÁLEZ, A. T. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0,25 ml y 0,5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. **Vet. Méx.**, v. 25, n. 2, p. 127-131, 1994.

MERCANTE, C. F. J.; ARRUDA, R. P.; NEVES NETO, J. R.; VISINTIN, J. A.; FAGUNDES, A. C. Congelamento do sêmen eqüino em etileno glicol ou glicerol: motilidade, vigor, e teste de termo-resistência. In: COLÉGIO BRASILEIRO DE



REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte. **Anais do Colégio Bras. Reprod. Anim.**, v. 11, p. 290, 1995.

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1982. v. 2, p.701.

MORAES, C. N.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D.; SCHEITZER, C. M.; LUZ, S. L. N. Eficácia do etileno glicol na criopreservação do sêmen ovino em pellets. In: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte, 1995. **Anais do Colégio Brás. Reprod. Ani.**, v. 11, p.312, 1995.

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

POLGE, C.; LOVELOCK J. E. Preservation of bull sperm at -70°C. **Vet Rec.**, v. 64, p. 296-297, 1956.

SAEG. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas**. Universidade Federal de Viçosa - UFV, Central de processamento de dados, Viçosa - MG, 2005.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F. *et al.* Uso do teste hipoosmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, p. 438-439, 2001.

SILVA, A. F. **Uso da dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de semen caprino**. 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

SOUZA, A. F.; GUERRA M. M. P.; BATISTA, A. M.; MERGULHÃO, F. C. C.; NEVES, A. C.; WISCHRAL, A. Congelação de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etileno glicol. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Supl. 5, p. 103-105, 2002.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.) **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p. 189.